

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO GÊNERO “AGRIOCLEPTES” STAL, 1866 (Apiomerinae, Reduviidae, Hemiptera)¹

PETR WYGODZINSKY

Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 26 figuras no texto)

Durante um estudo que fizemos recentemente sobre algumas espécies do gênero *Heniartes* Spinola, 1840, examinamos também o nosso material de *Agriocleptes* Stal, 1866, gênero extremamente próximo do primeiro mencionado.

Achamos a única espécie até agora descrita e encontramos, ainda, duas espécies novas para a ciência; as descrevemos aqui, aproveitando os conhecimentos morfológicos adquiridos no estudo intensivo das espécies de *Heniartes*.

Apresentamos uma redescrição do gênero, baseada nas descrições de STAL:

Cabeça alongada, mais longa que o pronoto, ligeiramente curva no aspecto lateral; parte postocular distintamente mais comprida que a anteocular. Antenas compridas, atingindo o comprimento do corpo; muito delicadas; o 1º artículo ultrapassando muito o ápice da cabeça.

Colarinho com ângulos antero-laterais distintamente salientes. Sulco longitudinal mediano do lobo anterior do pronoto atingindo a sutura transversal, que separa o lobo anterior do posterior. Escutelo triangular, posteriormente com crista longitudinal mediana. Pernas delicadas, fêmures e tíbias com ligeiras nodosidades; fêmures anteriores da grossura dos medianos e posteriores; tíbias anteriores sem sulco distinto para a recepção dos tarsos. Tarsos anteriores com 2, medianos e posteriores com 3 artículos.

Córion dos hemélitros com duas áreas de secreção de cêra; membrana preta, com várias áreas mais claras, semihialinas.

¹ Recebido para publicação a 11 de dezembro de 1945.

Esta curta diagnose genérica é especialmente útil para a comparação com os gêneros mais afastados da subfamília. O nosso gênero difere de *Heniartes* apenas pela cabeça mais comprida que o pronoto (em *Heniartes* são de comprimento idêntico), pelas áreas de secreção de cêra no cório dos hemélitros (ausentes naquele gênero) e pela membrana não uniformemente escura (em *Heniartes* não existem manchas mais claras).

Não falaremos aqui sobre a morfologia externa e o valor taxonômico das várias partes do corpo; os resultados do nosso estudo sobre *Heniartes* podem ser aplicados inteiramente no presente gênero.

A seguinte chave facilitará a determinação das espécies até agora conhecidas.

1. Antenas uniformemente escuras; fêmures uniformemente escuros; processos verticais do lobo anterior do pronoto muito curtos, tão longos quanto largos na sua base; aedeagus do macho sem processo lateral submediano..... *schubarti* n. sp.
- Base e ápice de alguns artículos das antenas com estreitos anéis claros; fêmures claros, com ou sem anéis distintos; processos verticais do lobo anterior do pronoto longos, mais longos que largos na sua base; aedeagus do macho com processo lateral submediano..... 2
2. Base das tíbias amarela, com distintos anéis muito escuros; fêmures de cor amarela, com distintos anéis escuros; 2.º e 3.º artículo das antenas mais compridos que o 1.º; processo dorsal do aedeagus do macho apicalmente bifurcado, entre as suas pontas sem saliência denteadas; cláasper do macho com pêlos finos e longos e algumas cerdas espiniformes curtas e fortes..... *albosparsus* (Stal)
- Base das tíbias prática e uniformemente amarela; fêmures praticamente de cor castanha clara uniforme; 2.º e 3.º artículos da antena do comprimento do 1.º; processo dorsal do aedeagus do macho bifurcado apicalmente, entre as pontas uma saliência semicircular denteadas; cláasper apenas com pêlos finos..... *stali* n. sp.

Agriocleptes albosparsus (Stal, 1854)

(Figs. 1 — 14)

Harpactor albosparsus Stal, 1854

Agriocleptes alboconspersus Stal, 1866

Agriocleptes alboconspersus Stal, 1872

Trichoscelis alboconspersus Walker, 1873

Sthienera albosparsa Walker, 1873

Harpactor albosparsus Walker, 1873

? *Heniartes erythromerus* Berg, 1879

Comprimento do corpo (hemélitros incluídos) da fêmea 9.5 — 10.0, do macho 9.0 — 9.5 mm.; largura máxima do torax da fêmea 2.5, do macho 2.0

mm.; largura máxima do abdômen da fêmea 3.0, do macho 2.8 mm. Forma geral conforme fig. 1.

Colorido: Cabeça preta. Lados do 1º e o terço ou metade basal do 2º artigo do rostro de cor amarela esbranquiçada. Antenas pretas; ápice do

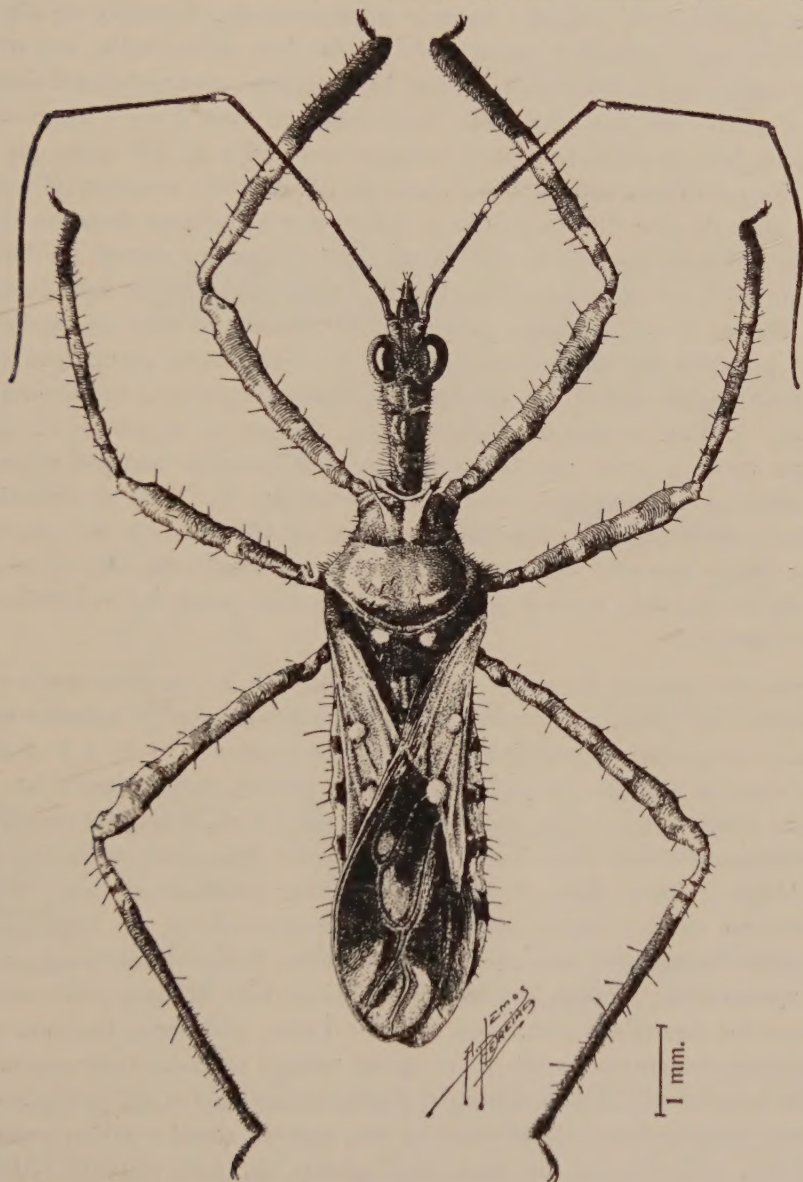


Fig. 1 — *Agriocleptes albosparsus* (Stal)

1º e base do 2º e 3º artigo com estreito anel amarelo esbranquiçado. Pronoto de cor vermelha alaranjada brilhante, ficando ligeiramente amarelada na parte central do disco do lobo posterior e quase preto na margem posterior dêste lobo, destacando-se uma faixa quase preta que acompanha a margem

posterior dêste lobo, sendo esta faixa, porém, não distintamente delimitada das regiões mais claras do disco. Pleura, esterno e coxas de colorido vermelho alaranjado bastante escuro, com regiões de colorido castanho escuro difuso; *acetabula* anteriores amarelas esbranquiçadas. Parte anterior do escutelo preta, parte posterior de colorido amarelo esbranquiçado. Fêmures de cor amarela, com 6 anéis castanhos escuros não muito bem delimitados, dos quais 1 basal, 1 apical e 4 submedianos, sendo êstes últimos arranjados em dois grupos de 2 anéis cada um. Base das tíbias amarela, com 2 ou 3 anéis escuros não muito bem delimitados; parte restante das tíbias de cor preta ou picea escura, ocupando esta região escura cerca de $1/2$ da tíbia anterior, $1/3$ da mediana e mais do que $2/3$ da posterior. Clavo dos hemélitros castanho escuro. Cório de colorido alaranjado não muito claro, castanho escuro na base, no disco e na parte apical, não sendo as regiões escuras nitidamente delimitadas das regiões claras. $1 + 1$ manchas subcirculares brancas de cera no meio e na margem posterior do cório, conforme fig. 1. Membrana preta, com regiões hialinas na porção apical das células e no ápice da própria membrana, conforme fig. 1. Face ventral do abdômen (fig. 4) com os segmentos de cor castanha no meio, e preta nos lados; hipopégio do macho amarelo claro, com $1 + 1$ manchas longitudinais escuras, conforme fig. 5. Toda a extensão dos esternitos com numerosas manchas circulares de cor amarela, no centro das quais se insere um pêlo comprido. Conexivo manchado de amarelo e preto, ocupando as manchas escuras cerca de $1/3$ da área total dos respectivos segmentos conexivais.

Feitio da cabeça e do rostro conforme figs. 2 e 3. Antenas muito delicadas, apenas com pêlos muito curtos; comprimento do seu 1º artículo igual a 1.6 mm.; comprimentos relativos dos artículos igual a $1 : 1.2 : 1.3 : 2.0$. Colarinho com os ângulos ântero-laterais muito grossos, subagudos, o seu ápice com uma cerda forte. Lobo anterior do pronoto com os lóbulos prolongados em processos verticais altos e delgados, no ápice dos quais se inserem duas cerdas longas e fortes (figs. 1, 2). Disco do lobo posterior elevado. Pêlos do lobo anterior finos e curtos, muito pouco numerosos; os do lobo posterior mais fortes e numerosos, sem arrumação definida. Escutelo subtriangular, subagudo apicalmente, a crista longitudinal mediana bem distinta posteriormente. Nervuras dos hemélitros conforme fig. 1. Tíbias anteriores bastante delicadas, ligeiramente curvas na sua parte apical, roliças na base, ligeiramente comprimidas apicalmente. Tíbias medianas distintamente curvas em todo o seu comprimento, ligeiramente comprimidas na sua metade distal. Tíbias posteriores quase retas, delicadas na sua base, mais grossas na parte restante. Abdômen com os ângulos póstero-laterais dos segmentos conexivais ligeiramente salientes.

Genitália da fêmea: Lobos do 8º esternito e gonapófises anteriores conforme fig. 11; gonapófises medianas conforme fig. 12; conjunto das gonapófises posteriores de forma subtrapezoidal (fig. 13), com $1 + 1$ grupos de cer-

das espiniformes subiguais. Conjunto do 9º e 10º tergito (fig. 14) muito largo; macroquetas pouco numerosas e bastante curtas.



Agriocleptes albosparsus (Stal) — Fig. 2: Cabeça e pronoto, aspecto lateral; fig. 3: cabeça, aspecto dorsal; fig. 4: abdômen do macho, aspecto lateral; fig. 5: hipopígio, aspecto ventral; fig. 6: detalhe do ápice do hipopígio; fig. 7: clássper; fig. 8: aedeagus, aspecto lateral; fig. 9: aedeagus, aspecto ventral; fig. 10: aedeagus, aspecto dorsal; fig. 11: lobo do 8.º urosternito da fêmea, com gonapófise anterior; fig. 12: gonapófise mediana; fig. 13: metade do conjunto das gonapófises posteriores; fig. 14: conjunto do 9.º e 10.º tergito. Originais.

Genitália do macho: Hipopígio conforme figs. 4 e 5; processos apicais curtos, arredondados (fig. 6). Clássperes (fig. 7) pouco curvos, com alguns pêlos curtos e na sua face ventral com algumas cerdas espiniformes grossas e fortemente esclerosadas. Aedeagus (figs. 9, 10, 11) curto e grosso; processo

dorsal (fig. 8 D) forte, bifurcado apicalmente, o envólucro atingindo o seu ápice; processos submedianos laterais (fig. 8 L) grandes, ligeiramente esclerosados, em posição transversal; processos terminais laterais superiores (fig. 8 S) e inferiores (fig. 8 I) muito grandes, simples, não esclerosados; placa ventral muito grande, porém não destacada, de forma subtriangular.

Distribuição: Goiânia, Goiaz, Rio Meia Ponte, 18-6-1942, F. LANE col. (1 fêmea, Departamento de Zoologia da Secretaria de Agricultura, São Paulo, com o número 105.480); Anápolis, Goiaz, 27-12-1935 (1 fêmea, Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, Rio de Janeiro); Campinas, Goiaz, BORGMEIER & LOPES col., 12-1936 (1 fêmea, I.E.E.A.); Lagôa Santa, Minas Gerais, 17-11-1940, LOPES col. (1 fêmea, Instituto Oswaldo Cruz, aos cuidados do Dr. HERMAN LENT); Carmo do Rio Claro, Sul de Minas, 12-1944, J. C. M. CARVALHO col. (1 macho, na coleção do autor); Viçosa, Minas Gerais, 12-1944, WYGODZINSKY col. (1 macho, na coleção do autor); Fazenda Penedo, Município Rezende, Itatiaia, Estado do Rio de Janeiro, 2-1943, WYGODZINSKY col. (1 fêmea, na coleção do autor); Fazenda São João, Onda Verde, São Paulo, F. LANE col., 1-1946 (1 macho, 1 fêmea, I.O.C., aos cuidados do Dr. H. LENT; 1 macho, I.E.E.A.; 1 macho, col. autor).

Agriocleptes stali n. sp.

(Figs. 15 — 19)

Esta nova espécie é extremamente próxima de *Agriocleptes albosparsus* (Stal); limitando-nos a indicar os caracteres diferenciais.

Forma e aspecto geral como em *albosparsus*.

Comprimento da fêmea 10.0, do macho 10.5 mm.

Colorido das pernas (fig. 15): Fêmures de cor castanha clara, com anéis amarelados estreitos e muito mal definidos, parecendo o artigo praticamente de cor castanha clara uniforme. Base das tíbias de cor amarela clara, com 2 estreitos anéis ligeiramente mais escuros, nem sempre bem distintos, parecendo assim a região basal das tíbias praticamente de cor amarela clara uniforme. Meso e metapleura de cor picea muito escura.

Comprimento relativo dos artigos das antenas igual a 1 : 1.0 : 1.0 : 1.2 ou mais, isto é, o 2º e 3º artigo são apenas do comprimento do 1º.

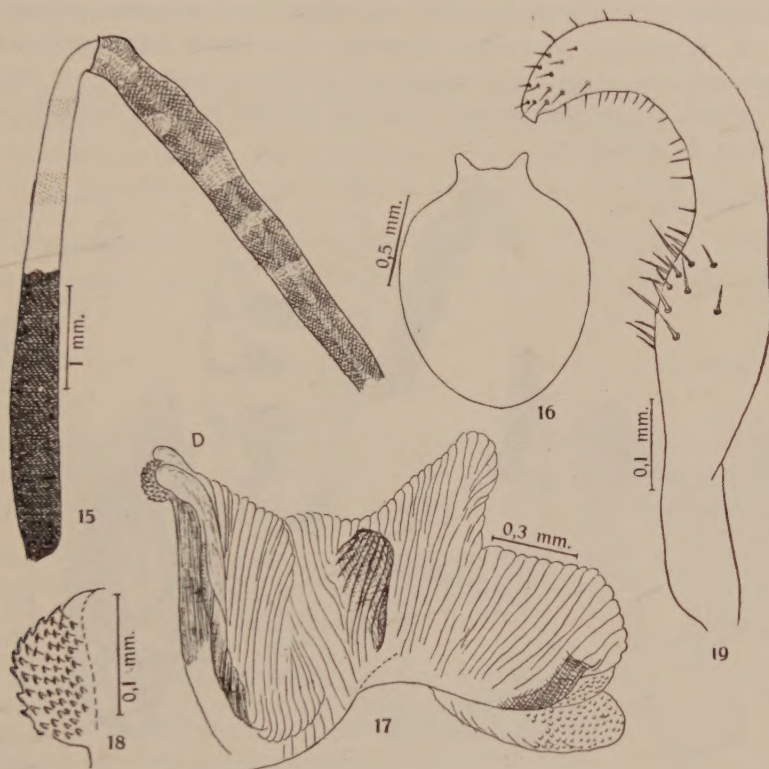
Genitália da fêmea como em *albosparsus*.

Genitália do macho parecida com a de *albosparsus*, porém os processos distais do hipopégio mais afastados (fig. 16); clássper mais curvo, a sua face ventral apenas com pêlos curtos e delicados; processo dorsal do aedeagus (fig. 17 D) bifurcado apicalmente, entre as duas pontas uma saliência semicircular, denteada fortemente (fig. 18).

Distribuição: Campo Grande, Mato Grosso, 16-9-1927, MORAIS MELLO col. (macho holótipo, na coleção do Instituto Oswaldo Cruz, aos cuidados do

Prof. A. DA COSTA LIMA); Campo Grande, Mato Grosso, 5-9-1927, MORAIS MELO col. (fêmea alótipo, na coleção acima mencionada).

A espécie é dedicada a CARL STAL, cujos trabalhos são a base do estudo moderno da família *Reduviidae*.



Agriocleptes stali n. sp. — Fig. 15: Esquema do colorido da perna anterior; fig. 16: hipopégio, aspecto ventral; fig. 17: aedeagus, aspecto lateral; fig. 18: saliência do processo dorsal do aedeagus, em maior aumento; fig. 19: cláspes.

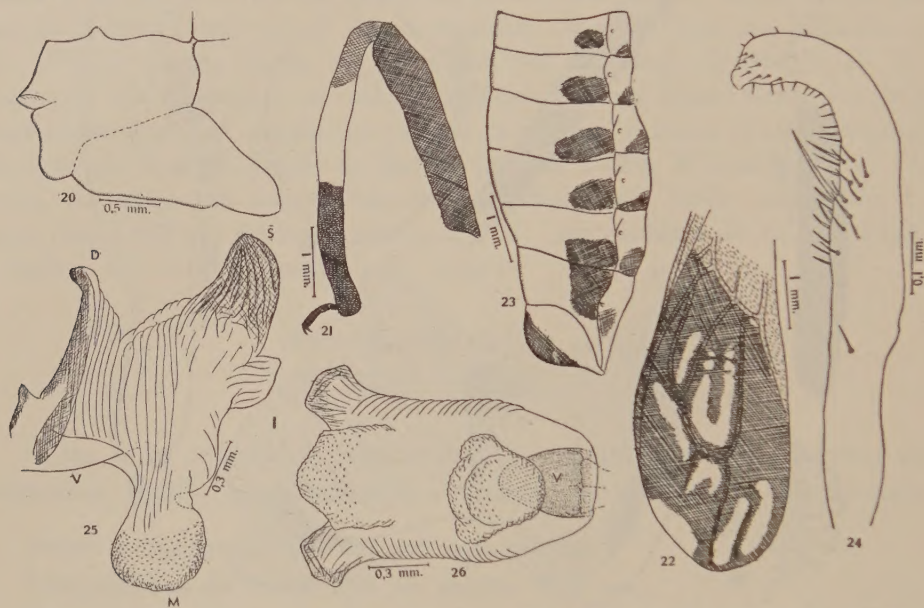
Agriocleptes schubarti n. sp.

(Figs. 20 - 26)

Comprimento do corpo (hemélitros incluídos) 11.0 — 11.5 mm.; largura do torax 3.5 mm., do abdômen 3.0 mm. Forma geral como em *albosparsus*.

Colorido: Cabeça preta. Lados do 1º e o terço basal do 2º segmento do rostro de cor amarela esbranquiçada. Antenas uniformemente de colorido vermelho muito escuro. Pronoto de colorido vermelho alaranjado, com o bordo posterior e os ângulos humerais mais escuros, quase pretos, não sendo, porém, esta região escura distintamente delimitada da mais clara. Pleura, esterno e coxas da cor do pronoto, Escutelo preto. Fêmures uniformemente de cor vermelha muito escura. Base das tíbias de cor picea escura, seguida de um largo anel amarelo claro, sendo o resto da tíbia de cor picea escura ou preta; esta

região escura ocupa cerca de $1/2$ do comprimento total da tíbia anterior, e $1/3$ da mediana e posterior. Cório dos hemélitros de colorido vermelho alaranjado, sendo mais escuro na sua base e na margem costal; com $1 + 1$ manchas brancas de secreção de cêra. Membrana com regiões hialinas como em *albosparsus*, porém ligeiramente mais extensas (fig. 22). Face ventral do abdômen vermelha, as partes laterais dos segmentos com manchas pretas, conforme fig. 23. Hipopígio do macho vermelho, com $1 + 1$ faixas pretas longitudinais submedianas, como em *albosparsus*. Conexivo manchado de claro e escuro, ocupando as manchas escuras cerca da metade da área total do respectivo segmento do conexivo.



Agriocleptes schubarti n. p. — Fig. 20: Pronoto, aspecto lateral; fig. 21: esquema do colorido da perna mediana; fig. 22: esquema do colorido da membrana do hemélitro; fig. 23: abdômen do macho, aspecto lateral; fig. 24: cláspes; fig. 25: aedeagus, aspecto lateral; fig. 26: aedeagus, aspecto ventral.

Cabeça como em *albosparsus*. Comprimento do 1º artículo das antenas 1.9 mm.; comprimentos relativos dos artículos igual a $1 : 1.1 : 1.0 : ?$ Colarinho com os ângulos ântero-laterais salientes, subagudos, o seu ápice com uma cerda forte. Lobo anterior do pronoto (fig. 20) com os lóbulos prolongados em curtos processos verticais, no ápice dos quais se inserem duas cerdas fortes. Pêlos do lobo anterior do pronoto curtos e finos, muito pouco numerosos e sem arrumação definitiva; os do lobo posterior bastante fortes e compridos, mas também pouco numerosos e sem arrumação definitiva. Tíbias anteriores quase retas, apenas muito ligeiramente curvas perto do seu ápice, e fortemente comprimidas em quase todo o seu comprimento. Tíbias medianas distintamente curvas e comprimidas em todo o seu comprimento. Tíbias posteriores retas, muito ligeiramente comprimidas perto da sua base.

Genitália da fêmea como em *albosparsus*.

Genitália do macho: Hipopígio como em *albosparsus*. Cláspes (fig. 24) relativamente grande, curvo apenas na região apical; sua face ventral com pé-

los finos e curtos, e uma única cerda mais forte e comprida. Aedeagus conforme figs. 25 e 26; processo dorsal simples, bífido apicalmente (fig 25 D); placa ventral (fig. 25 V) subtriangular, não destacada; processo lateral sub-mediano ausente; processo terminal lateral superior (fig. 25 S) muito grande, subagudo, distintamente esclerosado; processo terminal lateral inferior (fig. 25 I) muito pequeno e delicado; processo terminal mediano inferior (fig. 25 I) em forma de um saco simples.

Distribuição: Rio Branco, Pernambuco, SCHUBART leg. (no. Br. 955) (fêmea holótipo, guardada no Museu Nacional, Rio de Janeiro, com uma lâmina); Nordeste do Brasil, sem localidade, R. von IHERING col. (macho alótipo, Instituto Oswaldo Cruz, aos cuidados do Prof. A. DA COSTA LIMA).

A nova espécie é dedicada ao Dr. OTTO SCHUBART, que muito tem contribuído para o conhecimento da fauna do Nordeste do Brasil.

SUMMARY

The author gives a detailed redescription of *Agriocleptes albosparsus* (Stal), and describes two new species, both also from Brazil. The following key facilitates the determination of the three species of the genus.

1. Antennae and femora of uniform dark colouring; vertical process of anterior lobe of pronotum short, not longer than broad at base (fig. 20); aedeagus of male without lateral submedian process (fig. 25)..... *schubarti* n. sp.
- Base and apex of some joints of antennae with whitish annuli; femora yellowish, with or without distinct annuli; vertical processes of anterior lobe of pronotum long, longer than broad at base (fig. 2); aedeagus of male with lateral submedian process (figs. 8, 9)..... 2
2. Base of tibiae yellowish, with distinct dark coloured annuli; femora yellowish, with distinct dark annuli; second and third joint of antennae longer than first joint; dorsal process of aedeagus of male bifurcate apically, between its points no toothed process (fig. 8); clasper of male with simple hairs and some short and strong spiniform bristles (fig. 7)..... *albosparsus* (Stal)
- Base of tibiae practically uniform yellow; femora practically uniform clear brown; second and third joint of antennae as long as first joint; dorsal process of aedeagus of male bifurcate apically, between its points a semicircular toothed process (figs. 17, 18); clasper with short hairs only (fig. 19)..... *stali* n. sp.

BIBLIOGRAFIA

- STAL, C., 1854, Nya Hemiptera. *Oefv. Vet. Akad. Foerh.*, 11 (8): 231-255.
 STAL, C., 1866, Bidrag till Reduviidernas Kaennedom. *Oefv. Vet. Akad. Foerh.*, 23 (9) : 235-302.
 STAL, C., 1872, Enumeratio Reduviinorum Americae. In: Enumeratio Hemipterorum, pt. II: 66-128. *Kongl. Svensk. Vet. Akad. Hdl.*, 10 (4).

AÇÃO ANTIBACTÉRICA DAS URETANAS ¹

CARLO FOÁ e ALESSANDRO SEPPILLI

Toda a história da luta contra o b. da tuberculose, desde a descoberta de Koch até os nossos dias, está caracterizada pelas inúmeras tentativas feitas com o intuito de superar de qualquer modo, o obstáculo da chamada “membrana cérea”, quer dizer da componente lipídica que envolve, ou talvez embebe, o citoplasma daquele microorganismo. Toda a patologia, a imunologia e a quimioterapia das infecções produzidas pelos bacilos ácido-resistentes depende do caráter peculiaríssimo da constituição bioquímica destes bacilos.

As mais recentes tentativas de quimioterapia antituberculosa perseguem igual objetivo, e as pesquisas recentes de BIOCCA, entre outras, confirmam a oportunidade de procurar entre compostos lipossolúveis ou lipofílicos os possíveis quimioterápicos específicos contra os bacilos de Koch e de Hansen.

Há substâncias capazes de penetrar através da camada periférica das células em geral, devido ao seu poder de se dissolverem nos lípidos que a constituem e, reciprocamente, de dissolvê-los. Por serem dotados desse poder (chamado “lipoidolítico”) é que os narcóticos, segundo a antiga doutrina de OVERTON, penetrariam na célula nervosa, atuando sobre as suas funções.

Em experiências sobre a sobrevivência dos centros nervosos de rã isolados e artificialmente irrigados, HERLITZKA verificou que eles sobrevivem por mais tempo e em melhores condições quando à solução de Ringer-Locke se acrescentam uréia ou outras substâncias lipoidolíticas. Admitiu-se que os sais e a glicose do líquido de perfusão agem melhor sobre as células nervosas por serem “veiculadas” pela uréia, que os faria penetrar mais facilmente no próprio corpo celular.

¹ Recebido para publicação a 29 de dezembro de 1945.

Comunicado à Sociedade de Biologia de S. Paulo, na sessão de 8 de dezembro de 1945.

É oportuno lembrar que soluções de uréia e de uretana, mesmo possuindo uma pressão osmótica igual ou superior às isotônicas de cloreto de sódio, não evitam a hemólise provocada pela água, na qual as ditas substâncias estão dissolvidas, e isto devido à capacidade (como lipoidolíticos) de atravessarem livremente as hemácias.

Foi lembrando esse conjunto de experiências, que um de nós (FoÁ) pensou em fazer uso de substâncias lipoidolíticas para com elas veicular quimioterápicos, facilitando-lhes a penetração nos bacilos de Koch.

A prova experimental, nos limites por nós ensaiados, não confirmou (como vamos ver) esta previsão, mas, por outro lado ocasionou certas verificações, que nos induziram a modificar o programa inicial e a completar as primeiras observações com outras em campo diferente. As provas feitas demonstraram uma ação antibacterica bastante intensa da uretana etilica e ainda mais das uretanas superiores (propilica e butilica), não somente sobre o b. de Koch, como também sobre outras bactérias, não ácido-resistentes.

É precisamente destas provas que pensamos útil dar um breve relato.

Na literatura médica existem várias referências à ação antisséptica da uréia: lembramos, entre outros, os trabalhos de PEJU & RAJAR (1906), de SYMMERS & KIRK (1915), de FOULGER & FOSHAY (1934). A sua ação sobre o b. de Koch foi demonstrada por CUMMINS (1942). O emprego da urina no tratamento das feridas e chagas infectadas é muito antigo e ainda hoje de uso empírico popular.

Em tempos recentes foi preconizado o emprêgo da uréia, isoladamente ou em associação com sulfanilamidas, nas feridas infectadas, por HOLDER & MCKAY (1942) e por ILFELD (1943). TSUCHIYA & colab. (1942) demonstraram a sua ação inibidora sobre os antagonistas das sulfas (ácido para aminobenzóico e metionina), o que foi confirmado por LEE, EPSTEIN & FOLEY em 1943.

Sobre as uretanas há poucas referências e parece-nos que a elas não foi dedicada até hoje muita atenção neste campo. Pesquisas de MELDRUM (1930), TAYLOR (1933) e HARVEY (1935) demonstraram a ação depressiva da uretana etilica, em concentração adequada, sobre a respiração das leveduras e das bactérias luminescentes.

WEINSTEIN & McDONALD, num trabalho publicado neste ano e que chegou ao nosso conhecimento quando já as nossas experiências estavam no fim, demonstraram a ação bacteriostática e bactericida da uretana etilica, propilica e butilica sobre várias bactérias

gram-positivas e gram-negativas, em série de atividade crescente com o peso molecular, a partir da uréia até a butiluretana. Os mesmos AA. constataram que as ditas substâncias, seja pela sua ação antagônica dos inibidores das sulfas, seja pelo aumento de solubilidade das mesmas, por elas provocado, reforçam a ação antibacterica das sulfanilamidas.

Sem acompanhar a ordem cronológica das nossas experiências e com o intuito de tornar mais simples e clara a exposição, relataremos os resultados obtidos na ordem seguinte:

a) ação bacteriostática das uretanas sobre o *B. coli* e o *Micr. pyogenes* var. *aurea*

b) ação bacteriostática e bactericida das uretanas sobre o *Mycobact. tuberculosis* var. *hominis*

c) provas de associação das uretanas com sulfanilamidas e sulfonas.

A) AÇÃO BACTERIOSTÁTICA DAS URETANAS SOBRE O *B. COLI* E O *MICR. PYOGENES* var. *AUREA*

As provas foram feitas acrescentando-se ao caldo comum as uretanas na proporção necessária para alcançar a concentração indicada. Os tubos (10 cm³), deixados 5 dias em termostato para controle de esterilidade, foram depois semeados com 1 alça normal de cultura de 24 horas. Leitura depois de 3 dias de incubação a 37°C.

		B. COLI			MICR. PYOGENES		
Testemunhas:.....		+	+	+	+	+	+
Etiluretana a	5%.....	—	—	—	—	—	—
»	2%.....	—	—	—	+	+	+
»	1%.....	+	+	+	+	+	+
»	0,5%.....	+	+	+	+	+	+
Propiluretana a	5%.....	—	—	—	—	—	—
»	2%.....	—	—	—	—	—	—
»	1%.....	—	—	—	+	+	+
»	0,5%.....	+	+	+	+	+	+
Butiluretana a	5%.....	—	—	—	—	—	—
»	2%.....	—	—	—	—	—	—
»	1%.....	—	—	—	+	+	—
»	0,5%.....	+	+	+	+	+	+
»	0,2%.....	+	+	+	+	+	+

As provas referidas no quadro acima demonstram:

a) que as uretanas efetivamente exercem ação bacteriostática sobre o *B. coli* e o estafilococo, gram-negativo o primeiro e gram-positivo o segundo:

b) que tal ação é crescente com o peso molecular e, portanto, maior na butiluretana que na propiluretana, e maior nesta que na etiluretana;

c) que a mesma ação é mais evidente sobre o *B. coli* que sobre o estafilococo;

d) que, enfim, a concentração mínima da butiluretana ativa sobre o *B. coli* é de 1%, ao passo que a concentração mínima da etiluretana ativa sobre o estafilococo é de 5%.

B) AÇÃO BACTERIOSTÁTICA E BACTERÍCIDA DAS URETANAS SÔBRE O MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS var. HOMINIS

1.º — *Ação bactericida*: Estas provas foram feitas suspendendo uma alça normal de uma cultura de 1 mês de b. de Koch em Petrag-nani na solução aquosa das uretanais, deixando a suspensão a 37°C por 24 horas e semeando enfim 1/10 cm³ da suspensão em Petrag-nani.

	I			II		
Testemunhas (o mesmo tratamento em água destilada).....	+	+	+	+	+	+
Etiluretana a 10%.....	—	—	—	—	—	—
» 5%.....	+	—	—	+	—	—
» 2%.....	+	+	+	+	+	+
» 1%.....	+	+	+	+	+	+
» 0,5%.....	+	+	+	+	+	+
Propiluretana a 10%.....	—	—	—	—	—	—
» 5%.....	—	—	—	—	—	—
» 2%.....	—	—	—	—	—	—
» 1%.....	+	+	—	+	—	— (*)
» 0,5%.....	+	+	+	+	+	+
Butiluretana a 10%.....	—	—	—	—	—	—
» 5%.....	—	—	—	—	—	—
» 2%.....	—	—	—	—	—	—
» 1%.....	—	—	—	—	—	—
» 0,5%.....	+	+	—	+	—	— (*)
» 0,2%.....	+	+	+	+	+	+

Nota: As provas foram repetidas lavando a suspensão, depois de tratamento, por três vezes em água destilada, com os mesmos resultados.

(*) Estas provas foram repetidas por mais duas vezes: tanto num caso como no outro alguns tubos deram resultado — — —.

As provas referidas no quadro acima demonstram:

- que as uretanais exercem ação bactericida sobre o b. de Koch;
- que a dita ação é mais intensa na propil e butiluretana, do que na etiluretana (ligeiramente mais intensa na butil do que na propiluretana);

c) que a butiluretana a 1% (e em alguns casos também a 0,5%) mata o b. de Koch humano em 24 horas a 37° C.

Para verificar mais exatamente a importância do fator tempo, as provas com a butiluretana foram repetidas retirando, depois de 3, 6, 9, 24 horas de tratamento, nas mesmas condições, 0,1 cm³ de suspensão e semeando da mesma maneira. Eis, abaixo, os resultados destas provas:

Testemunhas.....		+	+	+
		+	+	+
Butiluretana a 1% — 3 hs.....		+	+	+
6 ».....		+	+	+
9 ».....		+	+	—
24 ».....		—	—	—
Butiluretana a 0,5% — 3 hs.....		+	+	+
6 ».....		+	+	+
9 ».....		+	+	+
24 ».....		+	—	—

Estes resultados demonstram que a ação é muito lenta.

2º — *Ação bacteriostática*: Estas provas foram feitas juntando a butiluretana ao meio de Petragnani, antes de solidificá-lo. Completada, então, a preparação e controlada a esterilidade, era feita a semeadura, de acordo com a técnica usual.

Testemunhas (Petragnani normal)		+	+	+
» » »		+	+	+
Petragnani + butiluretana a 0,5%		—	—	—
» » »		—	—	—
» » a 0,1%		+	+	+
» » »		+	+	+
» » a 0,05%		+	+	+
» » »		+	+	+

Tais resultados demonstram que a ação bacteriostática é da mesma ordem de grandeza da ação bactericida.

C) PROVAS DE ASSOCIAÇÃO DAS URETANAS COM AS SULFANILAMIDAS E SULFONAS

Estas provas foram tôdas feitas até agora somente no campo da ação bactericida sobre o b. de Koch. A técnica é a mesma já descrita anteriormente. O tempo de ação foi sempre de 24 horas a 37°C.

1.º — Associação da etil e butiluretana às sulfanilamidas:

Solução A:	sulfanilamida.....	g.	1,0
	sulfatiazol.....	g.	0,1
	água dist.....	cm ³	100
Solução B:	sulfanilamida.....	g.	1,0
	sulfatiazol.....	g.	0,1
	etiluretana.....	g.	10,0
	água dist.....	cm ³	100
Solução C:	sulfanilamida.....	g.	1,0
	sulfatiazol.....	g.	0,1
	butiluretana.....	g.	0,5
	água dist.....	cm ³	100
	SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B	SOLUÇÃO C
Testemunhas:.....	+ + +	+ + +	+ + +
Solução pura:.....	+ + +	— — —	— — —
Sol. diluída 1/ 10:.....	+ + +	+ + +	+ + +
Sol. diluída 1/100:.....	+ + +	+ + +	+ + +

Nota: Nas soluções B e C puras as uretanas já se encontram em concentração bactericida.

2.º — Associação da etil e butiluretana às sulfonas (Promin):

Solução D:	"Promin".....	g.	15,0
	água dist.....	cm ³	100
Solução E:	"Promin".....	g.	15,0
	etiluretana.....	g.	10,0
	água dist.....	cm ³	100
Solução F:	"Promin".....	g.	15,0
	butiluretana.....	g.	0,5
	água dist.....	cm ³	100
	SOLUÇÃO D	SOLUÇÃO E	SOLUÇÃO F
Testemunhas:.....	+ + +	+ + +	+ + +
Solução pura:.....	— — —	— — —	— — —
Solução diluída 1/10:.....	— — —	— — —	— — —
» » 1/100:....	— — —	— — —	— — —
» » 1/1000:...	+ + +	+ + +	+ + +
» » 1/10000:..	+ + +	+ + +	+ + +

Mantendo constante a concentração das uretanas e diluindo progressivamente o "Promin", foram preparadas ainda as soluções seguintes:

Solução E ₂ :....	"Promin".....	g.	0,15
	etiluretana.....	g.	1,0
	água dist.....	cm ³	100

Solução E ₃ :...	"Promin".....	g. 0,015
	etiluretana.....	g. 1,0
	água dist.....	cm ³ 100
Solução F ₂ :...	"Promin".....	g. 0,15
	butiluretana.....	g. 0,5
	água dist.....	cm ³ 100
Solução F ₃ :...	"Promin".....	g. 0,015
	butiluretana.....	g. 0,5
	água dist.....	cm ³ 100

com os seguintes resultados:

SOLUÇÃO E ₂	SOLUÇÃO E ₃	SOLUÇÃO F ₂	SOLUÇÃO F ₃
— — —	+ + +	— — —	— — —

Pode-se acrescentar que, diluindo ainda mais o "Promin" em presença de 0,5% de butiluretana o resultado continua o mesmo (sol. F₁, F₅, F₆); quer dizer que 0,5% de butiluretana são suficientes por si sós, qualquer que seja a concentração do "Promin", para matar o bacilo.

Destas provas resulta que, quanto à ação bactericida sobre o b. de Koch, nenhuma vantagem provém da associação (nas concentrações e com a técnica por nós experimentadas) dos dois tipos de antissépticos (uretana + sulfas ou uretana + "Promin").

CONCLUSÕES

1. Fica confirmada a ação antibacterica das uretanais, tanto sobre os gram-negativos como sobre os gram-positivos.

2. Tal ação aumenta com o peso molecular, sendo maior na uretana butilica (butilcarbamida) do que na propilica (propilcarbamida), e maior nesta do que na etilica (etilcarbamida ou uretana s. s.).

3. A ação antibacterica das uretanais se exerce também sobre o bacilo de Koch, como ação bactericida, na mesma série de atividade já indicada no item anterior.

4. A concentração da butiluretana necessária para matar o bacilo de Koch em 24 horas de contato, nas condições por nós experimentadas, oscila entre 0,5 e 1,0%.

5. No que se refere à ação bactericida parece que a associação das uretanais às sulfanilamidas ou ao "Promin" não aumenta a atividade destas substâncias sobre o b. de Koch.

RESUMO

Os AA. estudaram a ação bacteriostática e bactericida das uretanais (etilica, propilica e butilica) sobre o b. de Koch.

Resulta das provas feitas que as três substâncias exercem ação bactericida de valor crescente com o peso molecular sobre o dito bacilo.

A butiluretana, a mais ativa, mata o b. de Koch em 24 horas na concentração de 0,5 — 1,0%.

Algumas tentativas de associação das uretanas com sulfanilamidas ou com "Promin" não demonstraram aumento na atividade bactericida própria destas substâncias por efeito da associação.

BIBLIOGRAFIA

- BIOCCA, E., 1945, Contribuição ao estudo da quimioterapia das infecções produzidas por germes álcool-ácido-resistentes (tuberculose e lepra). Observações sobre o valor tuberculostático do radical tricloroacético. Novas substâncias tuberculostáticas "in vitro". *Arq. Biol.*, S. Paulo, 29: 97-107.
- CUMMINS, S. L., 1942, Urea and its effect on tubercle bacilli. *Brit. Med. J.*, 1: 609.
- FOULGER, J. H. & FOSHAY, L., 1935, Antiseptic and bactericidal action of urea. *J. Lab. Clin. Med.*, 20: 1113.
- HARVEY, E. N., 1935, Luciferase, the enzyme concerned in luminescence of living organisms. *Ergb. Enzymforsch.*, 4: 365-379.
- HOLDER, H. G. & MACKAY, E. M., 1942, Wound therapy with special reference to application of carbamide-sulfonamide mixtures to contaminated and infected wounds. *Mil. Surg.*, 90: 509-518.
- HOLDER, H. G. & MACKAY, E. M., 1943, Carbamide-sulfonamide mixtures in wound therapy. *Surgery*, 13: 677-682.
- ILFELD, F. W., 1943, Carbamide sulfonamide mixtures. Use in treatment of compound fractures and traumatic wounds. *Surg., Gyn. & Obst.*, 76: 427-437.
- LEE, S. W., EPSTEIN, J. A. & FOLEY, E. J., 1943, Synergism of urea and sulfathiazole on *E. coli*. Effect of inoculum size. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 107-108.
- LEE, S. W., EPSTEIN, J. A. & FOLEY, E. J., 1943, Synergism action of thiourea and guanidine with sulfathiazole. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 105-107.
- MELDRUM, N. U., 1930, The behaviour of glutathione in yeast. *Biochem. J.*, 24: 1421-1427.
- PÉJU, G. & RAJAT, H., 1906, Note sur le polymorphisme des bactéries dans l'urée. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 61: 477-479.
- SYMMERS, W. S. C. & KIRK, T. S., 1915, Urea as a bactericide and its application in the treatment of wounds. *Lancet*, 2: 1237-1239.
- TAYLOR, G. W., 1934, The effect of narcotics on respiration and luminescence in bacteria with special reference to the relation between the two processes. *J. cell. Comp. Physiol.*, 4: 329-348.
- TENENBERG, D. J., TSUCHIYA, H. M., CLARK, W. G. & STRAKOSCH, E. A., 1942, *In vitro* effect of sulfonamides plus urea on *Escherichia coli* in presence of para-aminobenzoic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 247-249.
- TSUCHIYA, H. M., TENENBERG, D. J., CLARK, W. G. & STRAKOSCH, E. A., 1942, Antagonism of anti-sulfonamide effect of methionine, and enhancement of bacteriostatic action of sulfonamide by urea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 50: 262-266.
- TSUCHIYA, H. M., TENENBERG, D. J., STRAKOSCH, E. A. & CLARK, W. G., 1942, *In vitro* effect of urea sulfathiazole combination on sulfathiazole-resistant Staphylococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51: 245-247.
- WEINSTEIN, L. & McDONALD, A., 1945, The effect of urea, urethane and other carbamates on bacterial growth. *Science*, 101: 44-45.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A TROMBINA OBTIDA DO CÉREBRO DE COELHO E A DO VENENO DA “VIPERA RUSSELLII”¹

ALBERTO BARBOSA HARGREAVES

Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

Após o trabalho inicial de QUICK (12) numerosas têm sido as tentativas de aperfeiçoamento ou simplificação de sua técnica para dosagem da protrombina no plasma sanguíneo.

É sem dúvida sobre a obtenção e conservação da tromboplastina que reside a maior dificuldade na execução da dosagem da protrombinemia.

Entre as modificações existentes, a de FULLERTON (1), na qual a tromboplastina proveniente de cérebro de coelho é substituída pelo veneno da *V. russellii* “Stypven”, é a que realmente nos parece melhor.

Depois de FULLERTON, poucos têm estudado o assunto neste sentido, sendo entre os americanos, PAGE e seus colaboradores os que maior interesse têm demonstrado pela questão; de fato, em 1941 PAGE & RUSSEL iniciaram uma série de publicações sobre a dosagem da protrombina por meio do veneno de Russel (5) seguindo-se o estudo do tempo de coagulação em relação à concentração da protrombina do plasma humano (6), o do efeito da lecitina sobre o veneno (7), o da relação entre a concentração do fibrinogênio do plasma e o tempo de coagulação com o veneno (8); estudaram ainda a estabilidade do material sob várias condições de conservação (9) e também a relação com a concentração do ion cálcio (10).

Apesar dos resultados concordantes com os da tromboplastina de cérebro de coelho, uma observação de TOCANTINS (11) foi motivo da presente investigação, que no entanto, veio confirmar as anteriores, embora deixando sem explicação a referida observação. Trabalhando

¹ Recebido para publicação a 3 de maio de 1946.

Trabalho executado no Laboratório de Biofísica da Faculdade Nacional de Medicina.

com plasma normal e de hemofílicos, TOCANTINS observou que o defeito na coagulação do plasma de hemofílicos residia na quantidade excessiva nestes plasmas de substâncias de atividade antagônica à cefalina (anticefalinas); todas as preparações de tromboplastina por ele experimentadas sofriam a ação destas substâncias a não ser que elas fossem retiradas pela absorção em asbestos; o veneno de víbora de Russel, porém, mostra-se invulnerável à anticefalina do plasma.

Trabalhando com veneno de *B. jararaca* observamos que este veneno era capaz de transformar o fibrinogênio do plasma em fibrina, num tempo igual ao obtido com tromboplastina de cérebro de coelho, quando em presença do ion cálcio (2 e 3); em estudo posterior (4) pareceu-nos que se formava um complexo veneno-cálcio-fibrinogênio, insolúvel, razão porque, após separação do coágulo formado, não encontrávamos trombina solúvel no sobrenadante².

Sendo o veneno de Russel indiferente às substâncias do plasma antagônicas às tromboplastinas dos tecidos, procuramos investigar de um modo objetivo, qual o seu modo de agir sobre o fibrinogênio, se semelhante à tromboplastina de cérebro de coelho ou ao complexo cálcio-veneno de jararaca; é esta investigação o assunto do presente trabalho.

PARTE EXPERIMENTAL

Material:

- A) Soluções: Soro fisiológico a 7,5%
Cloreto de cálcio a 1,11%
Ácido sulfúrico a 2,94%
Hidróxido de bário (7H²⁰) a 5,1%
- B) Sangue: 30 cm³ de sangue de carneiro colhidos em balão Erlenmeyer com a quantidade correspondente de oxalato de amônio e de potássio para impedir a coagulação. Após centrifugação prolongada retiramos o plasma sobrenadante e preparamos:
 - a) plasma simples
 - b) plasma desfibrinado: 2cm³ de plasma em tubo de hemólise aquecido a 56-58° C durante 2 minutos e 30 segundos e centrifugado depois rapidamente para separação do precipitado formado

² ROCHA E SILVA & ANDRADE recentemente publicaram um artigo (*Arq. Inst. Biol.* 16:115-132) no qual confirmaram a nossa observação original de que o ion cálcio acelera a coagulação do plasma pelo veneno da *B. jararaca*; lamentavelmente, porém, estes A.A. afirmam ser nossa a conclusão "prematura de que o veneno de *Bothrops* possa ser usado em determinação do tempo de protrombina", quando no trabalho por eles citado (4) procuramos e julgamos ter demonstrado justamente o contrário.

- c) plasma desprotrombinizado: 2cm³ de plasma e 0,5cm³ de suspensão de sulfato de bário preparada do seguinte modo: mistura em partes iguais das soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de bário, centrifugação e lavagem do sulfato de bário precipitado com água destilada e resuspensão em volume igual ao inicial, de solução tampão de fosfato ácido de potássio-fosfato básico de sódio M/15, a pH 7,2
- d) fibrinogênio: 1 parte de plasma misturada a 1 parte de solução saturada de sulfato de sódio. Lavagem do precipitado com água destilada e resuspensão á 37°C em S. F., no qual dissolve-se completamente.

C) Tromboplastina: 0,3g de cérebro de coelho em pó, misturado a 4cm³ de S. F. e 2cm³ de solução de cloreto de cálcio. Deixamos 10 minutos em contato a 40°C, agitando-se de vez em quando. Usamos o líquido sobrenadante.

D) Veneno de *Vipera russellii*:³

- a) 0,5 mg de veneno seco dissolvido em 0,5cm³ de a. d. (solução a 1/1000)
- b) 0,25cm³ da solução a 1/1000 e 3,5cm³ de água destilada (solução a 1/15000).

Procurando verificar o papel da protrombina na coagulação do fibrinogênio pelo veneno de Russel, dispusemos uma série de 4 tubos (nos. 1, 2, 3, 4) nos quais distribuimos as soluções de veneno e cálcio e o plasma desfibrinado, de acôrdo com o exposto no Quadro I; deixamos em contato durante 10 minutos num B. M. a 37°C, após do que adicionamos, aos tubos nos. 1, 2 e 4, plasma simples e ao tubo nº 3 plasma-bário. Pela comparação dos tempos de coagulação dos 4 tubos vemos que no tubo 1, com plasma desfibrinado (mas com protrombina) a coagulação foi mais rápida que no tubo nº 2. Nos tubos 3 e 4, nos quais foram retirados, num o íon cálcio e no outro a protrombina, não houve coagulação. Dêste modo verificamos que a protrombina, bem como o cálcio, são indispensáveis á coagulação do fibrinogênio pelo veneno de vibora de Russel.

No entanto, como sabemos que o veneno não sofre qualquer ação das substâncias antagônicas à cefalina do plasma, procuramos investigar se a trombina resultante de sua ação sobre o plasma seria igual à proveniente da ação da tromboplastina (solúvel no sobrenadante do coágulo) ou do tipo que observamos resultante da união da fração coagulante da *B. jararaca*, i. é., um complexo de ação trombóide, mas insolúvel no sobrenadante do coágulo. Dêste

³ O veneno de *V. russellii* usado foi a preparação comercial "Stypven" "Russel viper venom", 0,5mg., Series RV 309 A., obtido por gentileza de "The Wellcome Physiological Research Laboratories", por intermédio de Burroughs Wellcome & Co. (U. S. A.) Inc., New York 17, N. Y.

QUADRO I

TRANSFORMAÇÃO DA PROTROMBINA DO PLASMA DESFIBRINADO EM TROMBINA

TUBO	Veneno 1/1000 (cm ³)	S.F. (cm ³)	Plasma desfibrin. (cm ³)	Cálcio (cm ³)	Deixar 10 min. contato a 37°C	Plasma (cm ³)	Plasma bário (cm ³)	Tempo de coagulação (seg.)
1.....	0,05	0,05	0,1	0,05		0,2	—	42 ½
2.....	0,05	0,15	—	0,05		0,2	—	51
3.....	0,05	0,15	—	0,05		—	0,2	não coag.

QUADRO II

COMPARAÇÃO ENTRE AS TROMBINAS PROVENIENTES DO VENENO E DA TROMBOPLASTINA

TUBO	Veneno 1/15000 (cm ³)	Trombo- plastina (cm ³)	Cálcio (cm ³)	Plasma (cm ³)	T.C. (seg.)	Sobrenadante do coágulo (cm ³)	Plasma (cm ³)	Tempo de coagulação (seg.)
5.....	0,5	—	0,5	0,5	38	0,4	0,2	15 ½
6.....	—	0,3	0,2	0,4	50	0,4	0,2	16
7.....	—	0,3	0,2	0,4 p. bário	não	—	—	—

QUADRO III

AÇÃO DO VENENO SOBRE SOLUÇÃO PURA DE FIBRINOGENIO

TUBO	Veneno		Plasma desfibr.	Cálcio	Solução fibrinogenio	T.C. (seg.)	Sobre- nadante do coágulo	Plasma	Tempo coagulação
	1/15000	1/1000							
8.....	0,35	—	—	0,35	0,35	> 240	—	—	—
9.....	—	0,05	0,2	0,1	0,20	120	0,2	0,2	24 seg.
	tromboplas- tina								
10.....	0,2		0,2	0,1	0,20	150	—	—	—

modo em um segundo grupo de tubos (nos. 5, 6 e 7, Quadro II) comparamos a ação da trombina recolhida do sobrenadante do coágulo obtido por meio da tromboplastina de cérebro de coelho e do veneno de Russel. Após a coagulação do fibrinogênio, retiravamos a rede de fibrina e o líquido sobrenadante era misturado a novo plasma; deste modo observamos que as trombinas obtidas de ambos os modos são solúveis no sobrenadante do coágulo e são capazes de coagular um novo plasma em tempo exatamente igual, traduzindo assim uma identidade pelo menos em seu modo de ação.

Estas experiências foram repetidas também usando em vez de plasma solução de fibrinogênio obtido do mesmo plasma original (sol. c) (Quadro III, tubos 8, 9 e 10); observamos assim que o Stypven não coagula o fibrinogênio; porém se se adiciona plasma desfibrinado (que contém protrombina), o fibri-

nogênio será então transformado em fibrina em tempo aproximadamente igual ao que se obtém com tromboplastina. A trombina formada pode ser recolhida do sobrenadante e é capaz de coagular um novo plasma tal como nas experiências do segundo grupo (tubos nos. 5 e 6 do Quadro II).

RESUMO

No presente trabalho procuramos comparar a trombina obtida por meio da tromboplastina de cérebro de coelho com a do veneno de Russel, parecendo-nos serem idênticas, ao menos em relação ao seu modo de ação.

SUMMARY

In this paper the thrombin derived from the rabbit's brain thromboplastin (Quick) is compared with the thrombin of Russel's viper venom. They seem to have identical actions.

BIBLIOGRAFIA

1. FULLERTON, H. W., 1940, Estimation of prothrombin; a simplified method. *Lancet*, 2: 195-196.
2. HARGREAVES, A. B., 1942, Dosagem da protrombina usando o veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), como tromboplastina, *O Hospital*, 22: 605-609.
3. HARGREAVES, A. B., 1943, Dosagem da protrombina usando o veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*), como tromboplastina (2ª. parte), *O Hospital*, 24: 87-93.
4. HARGREAVES, A. B., 1944, Estudos sobre a coagulação do plasma pelo veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*) em mistura com o cálcio; seu mecanismo de ação. *Rev. Brasil. Biol.*, 4: 367-389.
5. PAGE, R. C. & RUSSEL, H. K., 1941, Prothrombin estimation using Russel viper venom; simple modification of Quick's method. *J. Lab. Clin. Med.*, 26: 1366-1370.
6. PAGE, R. C. DE BEER, E. J. & ORR, M. L., 1941, Prothrombin; studies using Russel viper venom; relation of clotting time to prothrombin concentration in human plasma, *J. Lab. Clin. Med.*, 27: 197-201.
7. PAGE, R. C., DE BEER, E. J. & ORR, M. L., 1942, Effect of lecithinized Russel viper venom on prothrombin clotting time. *J. Lab. Clin. Med.*, 27: 830-834.
8. PAGE, R. C., DE BEER, E. J. BERCOVITZ, Z., 1943, Prothrombin; studies using Russel viper venom; relation between prothrombin clotting time and plasma fibrinogen concentration. *J. Lab. Clin. Med.*, 28: 910-912.
9. PAGE, R. C. & DE BEER, E. J., 1943, Prothrombin; studies using Russel viper venom; stability of thromboplastic-like activity of Russel viper venom under various conditions of storage. *Amer. J. Med. Sci.*, 206: 336-339.
10. KLEIMAN, A., PAGE, R. C. & PRISLER, P., 1945, Prothrombin studies using Russel's viper venom; effect of prothrombin clotting time of the concentrations of calcium and others salts. *J. Lab. Clin. Med.*, 30: 448-450.
11. TOCANTINS, L. M., 1945, Influence of the contacting surface on the coagulability and anticephalin activity of normal and hemophilic plasmas. *Amer. J. Physiol.*, 143: 67-76.
12. QUICK, A. J., 1938, The nature of the bleeding in jaundice. *J. Amer. Med. Ass.*, 110: 1658.

SÔBRE UM NOVO GÊNERO E UMA NOVA ESPÉCIE DE CHRYXINAE E CONSIDERAÇÕES SÔBRE A SUBFAMÍLIA (Reduviidae, Hemiptera) ¹

PETR WYGODZINSKY

Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 12 figuras no texto)

O achado de um novo gênero de *Chryxinae*, que difere do único gênero até agora conhecido por um caráter considerado como de valor para a definição de subfamílias de *Reduviidae*, é sem dúvida de alto interesse. Antes de discutir as questões gerais surgidas, apresentamos a descrição técnica do inseto.

Lentia n. g.

Cabeça transversal, fortemente inclinada imediatamente adiante dos olhos. Ocelos presentes, situados um pouco anteriormente à linha imaginária que liga os bordos posteriores dos olhos. Rostro muito curto e forte, curvo; 1º e 2º articulo de comprimento sub-igual, o 3º mais curto. 1 + 1 processos aguçados na face látero-ventral da cabeça, atrás da inserção do rostro. Tubérculos anteníferos inseridos na parte inclinada da cabeça, pouco distante dos olhos, dirigidos para frente. 1º articulo da antena forte, mais curto que a cabeça; 2º—4º artículos mais longos e mais delicados que o 1º.

Pescoço muito curto. Colarinho do pronoto distinto. Lobo anterior do pronoto mais curto que o posterior; ambos sem tubérculos ou espinhos. Escutelo triangular, espinho apical curto e simples.

Pernas simples, de tipo ambulatório, e de comprimento médio. Fêmur anterior ligeira mas distintamente mais grosso que o mediano e posterior, porém sem tubérculos ou espinhos ventrais. Fóssula esponjosa presente somente na tibia anterior. Tarsos de todos os pares com 3 artículos, sendo o basal o mais curto, e o 2º ligeiramente mais curto que o 3º. Unhas simples; cerdas pretarsais simples. Mesosterno com carena lateral curva, na qual se insere uma fileira de cerdas fortes e longas.

¹ Recebido para publicação a 12 de março de 1946.

Hemélitros com o cório e a membrana distintamente delimitados; cório com nervuras distintas e uma pequena célula costal; membrana com uma única célula grande.

Conexivo dorsalmente muito largo, ventralmente muito estreito. Abdômen ventralmente bem convexo.

Genótipo: *Lentia corcovadensis* n. sp.

O gênero é dedicado ao nosso colega e amigo Dr. HERMAN LENT, a quem devemos o incentivo para os nossos estudos sôbre os *Reduvioides*.

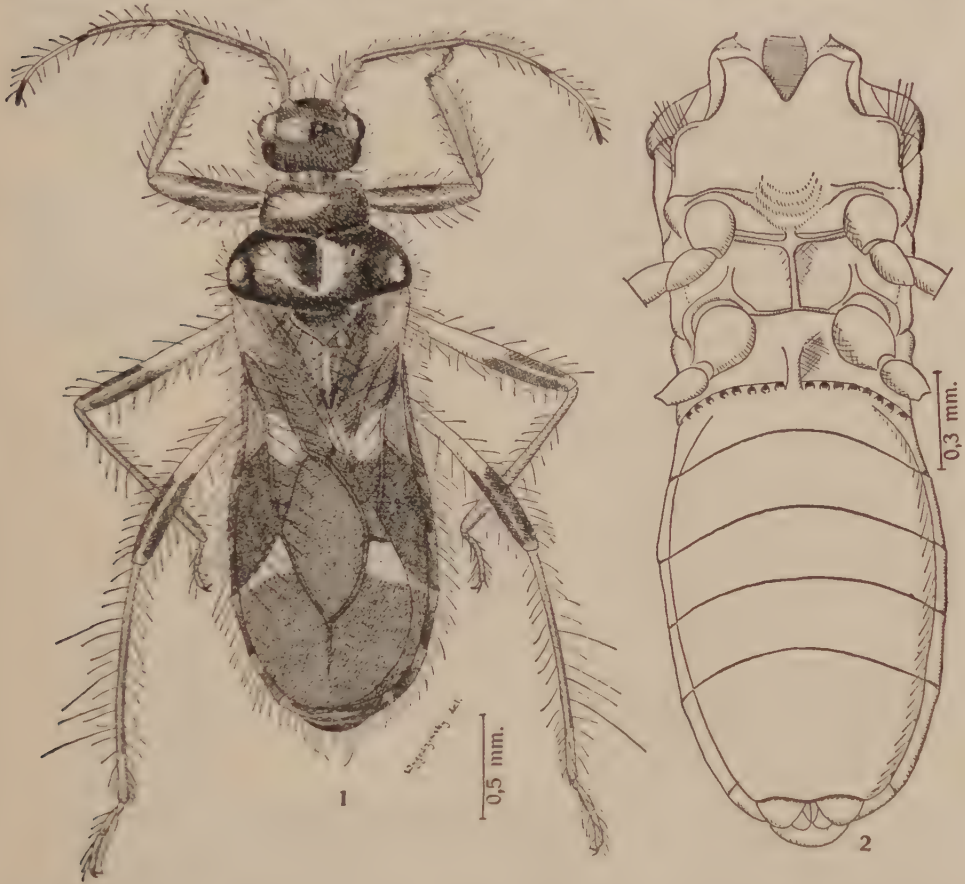
Lentia corcovadensis n. sp.

Fêmea — Comprimento do corpo 3.1 mm; largura máxima do tórax 0.9, do abdômen 1.0 mm.

Tegumento brilhante na cabeça e seus apêndices, no torax, nas pernas e no abdômen; hemélitros fôscos, com exceção de uma pequena célula costal do cório, que é brilhante e semihialina. Cabeça com os olhos, antenas, torax, pernas, nervuras do cório e margem costal dos hemélitros, assim como a face ventral e os bordos conexivais do abdômen com pêlos dourados muito longos e delicados, em número moderado, conforme fig. 1.

Colorido: Cabeça de cor castanha avermelhada não muito escura; rostro piceo escuro, com exceção do último artigo, que é mais claro. Olhos avermelhados; 1º artigo das antenas de cor castanha avermelhada clara, 2º e 3º artigo de cor castanha escura, 4º artigo branco, base e ápice com largo anel preto. Pescoço da cor da cabeça. Lobo anterior do pronoto de cor castanha avermelhada bastante escura, lobo posterior preto. Pleura e esterno de colorido castanho mais claro; acetábula medianas e posteriores, uma região acima do acetábulo mediano, e coxas medianas e posteriores esbranquiçadas; coxa anterior de cor castanha. Os 2/3 basais do fêmur anterior de cor castanha escura, o terço apical, assim como as tíbias anteriores, de colorido castanho amarelado claro. Os 3/5 basais dos fêmures medianos e posteriores brancos, os 2/5 apicais castanho escuros no fêmur mediano, quase pretos no posterior; apicalmente um estreito anel de cor amarelada. Tíbia mediana de cor castanha amarelada clara, a posterior de cor castanha escura, com a base e o ápice mais claros. Tarsos de todos os pares de cor castanha amarelada clara. Região anterior central do escutelo castanho escura, o restante castanho claro, e o ápice do processo distal preto. Cor geral dos hemélitros preta; clavo castanho escuro; base do cório esbranquiçada; membrana com 1 mancha esbranquiçada na margem externa, uma outra na margem interna, ambas ao nível do ápice do cório. Face ventral do abdômen de cor castanha avermelhada escura. Conexivo manchado; o terço anterior dos segmentos conexivais castanho avermelhado bastante claro, os 2/3 posteriores de cor castanha escura.

Cabeça conforme figs. 1 - 3, ovalar, transversal, tão larga quanto o lobo anterior do pronoto, fortemente inclinada adiante dos olhos. A face dorsal uniformemente convexa, o sulco transversal interocular apenas indicado por uma linha fina, no meio da qual nasce uma outra, dirigida para frente. Clipeo



Lentia corcovadensis n.g., n. sp. — Fig. 1: Fêmea, aspecto geral; fig. 2: torax e abdômen, aspecto ventral.

e *genae* distintos; *jugae* não distintas. Ocelos muito pequenos, não inseridos em saliência ou tubérculos especiais. Olhos pequenos, ocupando apenas uma pequena parte da face lateral da cabeça; a distância interocular dorsal $3.1/2$ vezes maior do que a largura de um olho, neste aspecto. Processos látero-ventrais da cabeça aguçados, conforme fig. 3. Rostro forte e curvo, conforme figs. 3 e 4; o 1º artículo ligeiramente mais longo que o 2º, o 3º muito mais curto. Tubérculos anteníferos distintos. 1º artículo das antenas curto e forte, mais curto que a cabeça; 2º artículo mais longo e mais fino; 3º e 4º longos, ainda mais delicados. Comprimento do 1º artículo 0.2 mm; comprimentos relativos dos artículos — 1 : 2.5 : 2.0 : 2.5. Todos os artículos com pêlos longos e finos em número moderado, cujo comprimento ultrapassa o do diâmetro dos respectivos artículos. Pescoço muito curto, simples.

Colarinho simples, arredondado nos seus ângulos ântero-laterais. Lobo anterior do pronoto subtrapezoidal, de cerca de $1/3$ do comprimento total do pronoto, alto e convexo, sem sulco mediano longitudinal distinto. Lobo posterior subtrapezoidal, muito mais largo que o anterior, o bordo posterior convexo; dividido em dois lóbulos por um sulco mediano longitudinal bastante profundo que tem seu início no sulco transversal que divide o lobo anterior e o posterior, e que termina um pouco adiante do bordo posterior do pronoto. *Humeri* ligeiramente elevados; bordo posterior do pronoto distintamente inclinado para baixo, em todo o seu comprimento.



Lentia corcovadensis n.g., n. sp. — Fig. 3: Cabeça, aspecto dorsal; fig. 4: cabeça, torax e abdômen, aspecto lateral; fig. 5: cabeça e pronoto, aspecto ventral; fig. 6: esquema das nervuras do hemélitro; fig. 7: perna anterior, face interna; fig. 8: tarso posterior; fig. 9: conjunto do 9° e 10° tergito; fig. 10: lobo do 8.º esternito, com gonapófise anterior; fig. 11: gonapófise mediana; fig. 12: gonapófise posterior.

Escutelo triangular, com uma excavação anterior mediana, cujo disco é plano e que é limitada por bordos elevados que se reúnem por trás, prolongando-se numa larga carena longitudinal que por sua vez se transforma, na parte posterior do escutelo, no espinho apical; êste é curto e forte, dirigido para cima e ligeiramente para trás.

Prosterno com o sulco estridulatório bastante largo. Meso e metasterno (fig. 5) com uma crista em forma de T; mesosterno lateralmente com uma carena fortemente curva, na qual insere uma fileira de cerdas longas e fortes. Pleuras distintas; a mesopleura maior que a metapleura (fig. 3).

Hemélitros quase atingindo o ápice do abdômen; o seu colorido descrito acima. As suas nervuras conforme descrição genérica e figs. 1 e 6.

Pernas de tamanho médio, as posteriores as mais longas; o seu colorido muito característico descrito acima. Fêmures anteriores ligeiramente mais grossos que os medianos e posteriores; tibia anterior curta, bastante alargada apicalmente, a fôssula esponjosa ligeiramente mais curta que o maior diâmetro do artícuo; pente subapical conforme fig. 7. Pernas medianas e posteriores simples, conforme fig. 1; tarsos conforme fig. 8. Pêlos dos fêmures atingindo, os das tibias ultrapassando o diâmetro dos respectivos artícuos; tibias posteriores na face externa com alguns pêlos finos extraordinariamente alongados.

Abdômen, na face ventral altamente convexo; a sua segmentação conforme fig. 5. 2º urosternito (1º visível) ligeiramente carenado no meio; o bordo anterior do 3º com uma série de impressões subovais. Conexivo muito estreito ventralmente, mais largo na face dorsal.

Genitália pouco saliente, composta das seguintes peças: Conjunto do 9º e 10º tergito, que se curva para baixo; 7º esternito, cujo bordo posterior é ligeiramente côncavo e um pouco saliente no meio, pelos lobos do 8º esternito, e pelas gonapófises anteriores, medianas e posteriores. O conjunto do 9º e 10º tergito é semicircular (fig. 9), e possui 1 + 1 grupos de macroquetas. Forma dos lobos do 8º esternito e das gonapófises anteriores conforme fig. 10; macroquetas presentes em número moderado. Gonapófises medianas conforme fig. 11; alguns pêlinhos muito curtos presentes. Gonapófises posteriores (fig. 12) subquadrangulares, com um grupo distal de macroquetas.

Localidade: Rio de Janeiro, D. F., Botafogo, floresta no pé do Corcovado, em terra fôfa no pé de uma árvore grande, 24 - 2 - 1946, Wygodzinsky col. (1 fêmea, holótipo, na coleção do I. E. E. A., com a lâmina no. 864).

O inseto, quando vivo, pelo seu colorido, seu pequeno tamanho, sua forma estreita e seus movimentos rápidos, se parece de um certo modo com certos *Cimicoidea*, como *Anthocoridae* ou *Miridae*, mormente *Fulvius quadristillatus* Stal: esta última espécie foi encontrada junto a *Lentia corcovadensis*.

O novo gênero se aproxima, por vários caracteres muito peculiares, de *Chryxus* Champion (fazemos a comparação com *C. travassosi* Lent & Wygodzinsky, que mais de perto conhecemos). Mencionamos os seguintes pontos:

Corpo com longos pêlos delicados, que também se acham sobre os olhos. Cabeça inclinada fortemente adiante dos olhos. 1.º artícuo das antenas curto e forte, os seguintes compridos e mais finos. Rostro muito forte e curto, fortemente curvo. Carena lateral do mesoesterno, com fileira de cerdas fortes. Pernas delicadas e simples; fôssula esponjosa apenas na tibia anterior. Escutelo com processo apical curto

e forte. Membrana com uma só célula. Conexivo dorsalmente largo, ventralmente muito estreito. Forma e quetotaxia dos escleritos que compõem a genitália da fêmea.

Os caracteres essenciais que separam *Lentia* de *Chryxus*, são os seguintes:

Cabeça muito larga. Ocelos presentes. Cabeça ventralmente com 1 + 1 processos aguçados (aliás esboçados em *Chryxus*). Pescoço muito curto. Cório com as nervuras distintas e com pequena célula costal. Forma geral mais estreita e delicada.

Como se vê da exposição acima, são numerosos e importantes os caracteres que ligam os dois gêneros, e poucos os que os separam, de modo que é imperioso reunir *Lentia* e *Chryxus* no mesmo agrupamento superior, que neste caso é a subfamília. Os caracteres divergentes são todos nitidamente genéricos, com exceção de um, que até agora tem sido considerado como caracter de subfamília. Referimo-nos à ausência ou presença dos ocelos.

Em algumas subfamílias, que se caracterizam, além de outros caracteres, pela presença de ocelos, existem às vezes espécimes de ocelos ausentes; neste caso, porém, trata-se invariavelmente de exemplares extremamente braquípteros, os quais, aliás, costumam sofrer ainda outras modificações morfológicas, na cabeça, no torax e no abdômen. É este o primeiro caso de uma subfamília de *Reduviidae*, que inclui lado a lado gêneros e espécies de hemélitros e asas normais, com ou sem ocelos.

Este achado em nada diminui o valor dos ocelos para a caracterização auxiliar de certas subfamílias do grupo. Citamos a respeito McATTEE & MALLOCH (1925):

"Any group of organisms must be classified on the basis of the characters it possesses, and the value these or other characters have in other groups, has nothing to do with the case".

A subdivisão da phalanx *Reduviiformes* ainda não é satisfatória; ao lado de grupos muito bem destacados, como as subfamílias *Holoptilinae*, *Emesinae*, *Ectrichodiinae* e outras, que possuem feitio morfológico inteiramente peculiar, existem agrupamentos, como p. ex. a subfamília *Reduviinae*, definidos no seu conjunto, mais pela ausência de caracteres peculiares do que por caracteres próprios.

A diagnose da subfamília *Chryxinae* pode ser feita por uma combinação de caracteres, como segue:

Chryxinae Champion, 1898

Reduviidae de tamanho médio ou pequeno.

Cabeça mais larga e mais alta que longa, fortemente inclinada adiante dos olhos. Sutura interocular distinta. Ocelos ausentes ou presentes, neste último caso situados entre os olhos. Rostro forte e curto, fortemente curvo. 1º artigo das antenas curto e forte, os três outros mais compridos e delicados.

Sutura transversal do pronoto situada adiante do meio. Escutelo triangular, o processo apical simples. Mesoesterno lateralmente com uma carena curva, na qual se insere uma série de cerdas fortes e longas. Coxas anteriores curtas, roliças. Pernas simples; os tarsos com três segmentos. Unhas simples. Hemélitros com o cório distintamente delimitado da membrana, a última de tamanho normal e com uma célula só; célula cubital ausente.

Glândulas abdominais presentes.

É bastante difícil fixar as relações dos *Chryxinae* com os outros *Reduviidae*, considerando a falta de muitos dados importantes. Os caracteres mais interessantes, que no seu conjunto não se repetem em outros *Reduviidae*, são a forma da cabeça e rostro, a carena lateral do mesoesterno e a membrana de uma célula só. Também *Microlestria* (*Reduviinae*) possui apenas uma célula na membrana, como ultimamente salientou USINGER (1943); mas nenhum outro caráter deste gênero nos permite compará-lo com os *Chryxinae*.

Pelas chaves que existem para a determinação das subfamílias de *Reduviidae*, o gênero *Lentia* será determinado como pertencente aos *Reduviinae*; os caracteres acima enumerados, porém, são suficientes para fazer a necessária separação.

O presente caso mostra outra vez a necessidade de uma revisão geral da phalanx *Reduviiformes*, baseada no mais completo material e no mais cuidadoso estudo possível. Bem sabemos que se trata de uma tarefa não muito fácil, já por dificuldades de material suficiente. Preparando o caminho para este trabalho, teremos que aprofundar cada vez mais o estudo morfológico e biológico dos *Reduvidae*, a fim de dar à ciência não somente espécies novas, mas também material novo para estudo de questões de interesse mais amplo.

SUMMARY

Lentia corcovadensis, new species belonging to a new genus, is described from Rio de Janeiro, D. F. It differs from the only other known genus of the subfamily, *Chryxus*, chiefly by the presence of ocelli. The presence or absence of ocelli in full winged specimens is considered a character of value for the

classification of subfamilies of *Reduviidae*; this character, however, cannot be used for the characterisation of the otherwise well defined *Chrysinæ*. An amplified diagnosis of the subfamily is given; its position is shortly discussed. The author finally calls the attention to the need for a more satisfactory subdivision of the *Reduviiformes*; to attain this goal, many detailed original studies will still be necessary.

BIBLIOGRAFIA

- CHAMPION, G. C. 1898. *Hemiptera Hemiptera*, pt. 2. Biol. cent. Amer., Insecta, Rhynchoptera XVI + 416 pp., 22 pls. London.
- IENT, H. & WYGODZINSKY, P., 1941. Sobre uma nova especie do género *Chrysa* Champion, 1898. *Chrysinæ, Reduviidae, Hemiptera, Rev. Brasil Biol.* 4 (2): 147-171, 19 figs.
- MCALIFFE, W. L. & MALLOCH, J. R. 1925. Revision of the American bugs of the reduviid subfamily Ploiariinae. *Proc. U. S. Nat. Mus.*, 67 (1): 156 pp., 9 pls.
- USINGER, R. L. 1943. A revised classification of the Reduvioides with a new subfamily from South America (Hemiptera). *Ann. Ent. Soc. America*, 36 (4): 602-618, 3 figs.

TERCEIRA CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA MORFOLOGIA DO AGENTE DA MOLÉSTIA DE LUTZ, NOS TECIDOS HUMANOS PARASITADOS¹

LUTCI BOGLIOLO

Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, Minas Gerais

(Com 29 figuras coloridas)

Conforme escreveu Fonteca (1) em 1939, "até agora não se conheceu sob o ponto de vista citológico as fases do processo de esporulação" do agente da moléstia de Lutz.² De fato, não somente as observações citológicas são escasas, como também subsiste ainda notável divergência entre os observadores sobre a estrutura do *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, 1929, nos tecidos humanos; sobre os processos pelos quais neles se multiplica e, enfim, sobre sua posição sintomática. Esta última, evidentemente, só poderá ser firmada quando forem bastante certos os conhecimentos sobre a estru-

¹ Recebido para publicação a 15 de março de 1946.

Versões da *Insônia de Ammono*, *Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais* (Prof. Lúci Bogliolo).

² Foi o termo de *moléstia de Lutz* adotado por Splendore, embora reconheça que a forma *Ammono* de Lutz se tenha associado de Lutz (Splendore) Almeida, também propriamente *Fonteca* e *Carini* (2).

De fato, se foi Lutz (3) quem descreveu as duas primeiras fases da moléstia em epitélio, foi Fonteca (4) quem afirmou categoricamente tratar-se de uma doença e que "sem dúvida nenhuma se trata de moléstia causada por um parasita". Os mesmos termos, e pela primeira vez, deu um nome ao seu agente causal. De resulto dos trabalhos de Splendore (5) surgiu a dúvida que pode tornar um ou outro termo por ele adotado tão igual ao adotado por Lutz e ao adotado quase contemporaneamente por Carini (10-13), e cuja genuinidade nunca foi contestada.

É também interessante observar que Fonteca, para descrever o agente da doença da moléstia de Lutz nos tecidos, usou quase as mesmas palavras empregadas por Lutz (14): "O agrupamento dos corpúsculos fúngicos é bastante característico. Geralmente há um núcleo no centro e outros pequenos ao redor, o que sempre me produziu a impressão de resultar de um processo de pinocitose, mas que não pode propriamente ser observado nos tecidos fúngicos (ou imediatamente fixados)". E Fonteca (15): "L'aggruppamento dei parassiti è nel tipo classico, consistente in un nucleo centrale su cui fanno sporgere disordinatamente numerosi

tura e o modo de reprodução do microorganismo, não só em sua fase saprofítica, como também em sua fase parasitária. Por estas razões, é justificado divulgar qualquer conhecimento acerca da estrutura do fungo, que possa ser útil para a solução das questões mencionadas.

Em duas notas precedentes (27, 28) demonstrei que a gemação é uma forma normal de reprodução do *P. brasiliensis* em sua fase parasitária. Demonstrei também que no cadáver, em alguns casos ou em alguns órgãos, pode predominar em absoluto, ou pode existir exclusivamente, a reprodução por gemação. Estes resultados foram obtidos principalmente mediante o emprego da prata amoniacal, a qual impregna a membrana externa das células do fungo evidenciando fácil e nitidamente os pedúnculos que unem uma célula à outra ou, melhor, a célula mãe às células filhas; porém, não evidencia a estrutura interna das células. Esta última, até agora, foi estudada nos cortes de tecidos incluídos em parafina e depois corados por vários processos (hematoxilinas; Masson e derivados; Gram e derivados; etc.). Porém, nenhum deles, segundo minha experiência, a qual se baseia no estudo histológico de cerca de 60 casos, evidencia de modo satisfatório a íntima estrutura das células do fungo. Resultados muito mais nítidos e instrutivos podem ser obtidos nas preparações por aposição (impresão) coradas com o Giemsa ou com a hematoxilina férrica segundo Heidenhain, sendo que este último processo, no estudo do *P. brasiliensis*, deu em minhas mãos resultados muito menos demonstrativos do que o primeiro. A coloração com o Giemsa para o estudo do

"altre minori, derivanti, indubbiamente, da gemmazione della precedente". Ainda, em outro trabalho (6), afirma SPLENDRE: "Quanto aos meus casos, que são três, devo dizer que num, cujo exame foi limitado ao material colhido pela raspagem da lesão, obtive cultura de um cogumelo completamente semelhante ao que foi isolado pelo Dr. Lutz, apresentando as colonias, especialmente em agar glicerinado, o aspecto característico filamentoso que por alguns observadores foi comparado à pele de ratinhos brancos". Não vejo como se possa duvidar desta afirmação de SPLENDRE. Assim, embora em um de seus quatro casos SPLENDRE tenha isolado não o agente da moléstia de Lutz, mas um levedo, é evidente que ele lidou com casos clínicos e histologicamente iguais aos de LUTZ e de CARINI; cujo agente causal apresentava nos tecidos morfologia idêntica à dos dois casos de LUTZ; e de alguns dos quais obteve culturas iguais às de LUTZ. Em outros termos, SPLENDRE lidou com casos autênticos de moléstia de Lutz.

A associação do nome de ALMEIDA aos dois precedentes, para designar a moléstia, é igual e plenamente justificada pelo fato de ser este pesquisador, primeiramente com SOUZA CAMPOS (14), e depois em numerosos outros trabalhos (15-27, etc.) quem deu clara demonstração de que o agente da moléstia de LUTZ é completamente diferente do *Coccidioides immitis* (Stiles) Rixford & Gilchrist, 1896, com o qual tinha sido identificado até então, apesar das observações de LUTZ e dos trabalhos de SPLENDRE.

Repito, portanto, que adoto a denominação *moléstia de Lutz* apenas por brevidade e por ser de mais fácil aceitação.

TABELA I

NÚMERO PROGRESSIVO	IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DA BIÓPSIA	FORMA CLÍNICA	CELULARES	INOCULAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DA CORAÇÃO	ORÇÃOS OU TISSIDOS EXAMINADOS				PROCESSO DE REPRODUÇÃO		OBSERVAÇÕES
						GÂNGLIOS LIN-FÁTICOS (1)	PELE	GENGIVA	BAÇO	(Geração ou brotamento simples)	(Geração múltipla (chamada esporulação exógena ou criptosporeação)	
1.	Fr. Alvo de Oliveira		Linfático-tegumentária	—	Sim. Eretroculturas	Sim	—	—	—	Não	Abundante	(1) Compactos, sem necrose, amolecimento ou supuração
2.	P. Ferreira Coelho	5023 5064	Idem	Sim	Sim	Sim	(2)	—	—	Muito escassa	Abundante	(2) Biópsia também da pele, mas preparações por aposição só dos gânglios linfáticos
3.	E. da Silva Maria	5139 5172	Idem (o lepra)	Sim	—	—	Sim	—	—	Abundante	Muito escassa	
4.	M. Marcelina	5245 5273	Linfática, e secund. tegumentária	Sim	Sim	Sim	(2)	—	—	Escassa	Abundante	
5.	M. Agenina Inacia	5254 (3)	Idem (em seguida generalização e morte)	Sim	Negativa	Sim	(2)	—	—	Abundante	Abundante	(3) Biópsia feita 4 meses antes da generalização do processo o da morte
6.	D. Maria de Jesus	5271	Visceral (esplenica)	Sim	Sim	—	—	—	Sim	Não	Muito escassa	
7.	I. Rosa	5330	Lesões ulcerosas das gengivas	Sim	—	—	—	Sim	—	Escassa	Escassa	

agente da doença de Lutz foi e é usado por um grande número de pesquisadores; porém, um estudo citológico sistemático do *P. brasiliensis* baseado neste processo, que eu saiba, ainda não foi feito. O objetivo desta nota é, justamente, descrever os resultados que puderam ser obtidos por este processo.

Utilizei sete casos provindos de vários serviços e hospitais de Belo Horizonte mas observados, todos, por mim. As lâminas por aposição eram feitas imediatamente após a extirpação, por biópsia, do tecido a ser estudado. Por controle, os fragmentos eram depois incluídos em parafina e os cortes corados pelos processos mencionados; outros, eram tratados pela prata amoniaca, de preferência segundo o processo de Perdrau. Na tabela adiante encontra-se um resumo do material usado, das pesquisas feitas, e dos resultados obtidos.

MORFOLOGIA DO "PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS"
(SPLENDORE) ALMEIDA, 1929, ESTUDADA NAS LÂMINAS
POR APOSIÇÃO CORADAS COM A HEMATOXILINA
FÉRRICA SEGUNDO HEIDENHAIN, OU COM O GIEMSA.

O estudo das preparações por aposição demonstra que o agente da moléstia de Lutz se apresenta sob aspectos muito diversos. Evidentemente, cada um deles está relacionado com uma fase da evolução do fungo. Para poder compreender sua biologia será necessário, pois, descrever antes, detalhadamente, a estrutura de cada forma, e depois procurar relacionar cada forma (expressão de uma fase) com as outras, de modo a ter uma idéia tanto completa quanto possível do ciclo que o *P. brasiliensis* atravessa nos tecidos do hospedor.

Nos tecidos humanos parasitados podem ser encontradas estas formas:

1) Células pequenas, medindo de 1 a 5μ , isoladas, independentes umas das outras; 2) células esféricas ou esferoidais, medindo de 6 a 20μ e contendo poucos e grossos grânulos de cromatina, irregularmente distribuídos; 3) células medindo de 6 a 20μ e cuja cromatina é ora difusa, ora disposta em filamentos; 4) células medindo de 12 a 30μ , contendo um número muito grande de grânulos de cromatina, frequentemente dispostos com uma certa ordem na zona periférica da célula; 5) células em gemulação múltipla, circundadas por um número, às vezes muito grande, de gêmulas ou células filhas (chamada criptosporulação ou esporulação exógena); 6) elementos em brotamento simples, às vezes formando cadeias curtas, lineares ou ramificadas; 7) células esféricas ou esferoidais, grandes (15 a 25μ), com substância cromatínica

difusa ou subdividida em minúsculos grânulos, e como pulverizada; e outras apresentando um estrangulamento (formas em divisão por estrangulamento? formas em conjugação?); 9) elementos, uns degenerados, outros mortos; 10) formas provavelmente de resistência.

1) Nas células pequenas (1 a 5μ) a cromatina se dispõe em bastonetes ou grânulos bastante grossos, cujas dimensões variam em relação com o volume da célula. No primeiro caso, especialmente quando o elemento é elipsóide, em naveta, as minúsculas células podem simular leishmanias, (figs. 1 - 4).

2) Células esféricas ou esferóides, medindo de 6 a 20μ e contendo poucos e grossos grânulos de cromatina, irregularmente distribuídos. Os grânulos, via de regra, são densos, fortemente coráveis, neles não se distinguindo estrutura de espécie alguma. Podem ser encontrados em qualquer parte da célula; porém, via de regra, uma parte ou todos eles agrupam-se em um setor do elemento. A cápsula da célula está "em repouso"; isto é, apresenta espessura e qualidades óticas uniformes em cada setor, não havendo adelgaçamento da mesma em pontos determinados (v. em seguida).

3) Células medindo de 6 a 20μ , cuja cromatina é ora difusa, ora em filamentos. Na forma difusa se apresenta como zonas ou manchas largas, irregulares, mais ou menos homogêneas e finamente granuladas, que ocupam uma parte, às vezes muito ampla, da célula. Coram-se em rosa pálido.

Os filamentos, por sua vez, podem-se apresentar enovelados ou distendidos e variamente ramificados, percorrendo toda a extensão da superfície celular. Raramente se encontram divididos em fragmentos os quais, pela regularidade da forma, do número e da disposição, poderiam ser interpretados como cromossomos. Deles, encontrei um máximo de 12. (figs. 9 - 13). Também neste tipo de célula a membrana ou cápsula não apresenta modificações, encontrando-se "em repouso" (v. em seguida).

4) Células medindo de 12 a 30μ , contendo um número muito grande de grânulos de cromatina, os quais, via de regra, são de volume mais ou menos igual um ao outro, esferoidais ou irregularmente poligonais. Em geral, se dispõem com uma certa ordem na zona periférica da célula. É este o tipo de célula na qual a cápsula apresenta

uma profunda modificação de sua estrutura, tal como não se encontra em nenhuma outra fase da vida parasitária do fungo.

A cápsula adelgaça-se em muitos pontos, distribuídos com perfeita regularidade, e equidistantes entre si (figs. 14 - 16). Nas células maiores, medindo até 30 μ , calculei que pode haver um máximo de cerca de cem pequenas zonas adelgaçadas. O processo de adelgaçamento processa-se de dentro para fora; por conseguinte, a superfície externa da cápsula e da célula continuam perfeitamente lisas, enquanto que a superfície interna, ou seja a face em contacto com o protoplasma, fica irregular, como que espinhosa (figs. 15 - 16). As zonas adelgaçadas, vistas nas preparações coradas pelo Giemsa — e devo frisar que com este processo tais particularidades podem ser estudadas de modo bastante satisfatório — são funiliformes. É sabido que, ao exame a fresco, pelo contrário, tem-se a impressão de que, na cápsula, se formam minúsculas fissuras ou canalículos cilíndricos, através dos quais sairiam, esporos especiais, não maduros. Devido à nitidez das preparações por aposição e da imprecisão com que esta fina particularidade estrutural da cápsula pode ser estudada nas preparações a fresco, sou levado a admitir que o aspecto evidenciado pelos métodos de aposição é aquele que corresponde à realidade, enquanto o segundo é uma aparência, devida às dificuldades óticas da observação.

Paralelamente à modificação da forma, processa-se na cápsula uma modificação da estrutura química. De fato, ela se torna basófila e com o Giemsa se cora intensamente em azul. É provável que também se modifique a sua consistência e se torne mais mole, mais elástica e distensível. Deste modo, as pequenas massas cromáticas, circundadas de uma certa quantidade de protoplasma, podem impelir facilmente para fora as pequenas zonas adelgaçadas da cápsula da célula-mãe. Formam-se assim pequenos brotos ou gêmulas distribuídos regularmente em torno da superfície da célula-mãe, conforme é conhecido e considerado característico do *P. brasiliensis*. Devo observar que o estudo das preparações por aposição demonstra que dentro da célula-mãe não existe formação e diferenciação de células filhas, ou de elementos ou corpos que possam ser comparados a esporos. Há apenas uma divisão da cromatina em um certo número de grânulos: divisão que, conforme se dirá daqui a pouco, provavelmente faz seguimento a complicados processos nucleares e precede a gemulação múltipla. Mas, como é sabido, e como é confirmado pela análise das

preparações por aposição, não há divisão do protoplasma nem formação de um esboço de cápsula em torno das massas cromatínicas. Portanto, não havendo aspectos citológicos que façam pensar na formação de esporos perfeitos ou imperfeitos dentro da célula-mãe, é evidente que esta não pode ser considerada como um esporangio. É evidente, outrossim, que o processo de reprodução não pode ser interpretado como uma esporulação perfeita ou imperfeita, mas deve ser chamado de **gemulação múltipla**.

Após a saída, pelo processo de gemulação, de todo o conteúdo da célula a cápsula fica vazia. As pequenas zonas adelgaçadas, após a saída da última gêmula, permanecem como tantos minúsculos peritutos redondos. Fato, este, que pode ser averiguado nas preparações com a prata amoniacal (ver no parágrafo 9).

5) As células em gemação múltipla (chamada criptosporulação, ou esporulação exógena) são conhecidas há muito tempo e, como é sabido, representam a forma que permite o diagnóstico específico do fungo nas preparações histológicas.

Não é freqüente, mesmo nas preparações por aposição, observar a continuidade entre a célula-mãe e as células filhas. Todavia, em casos raros, e mesmo nas preparações a fresco, se pode averiguar que a célula filha ou gêmula é uma continuação da célula-mãe, à qual é unida por um pedúnculo relativamente espesso em proporção ao volume diminuto da célula filha; é também revestida pela mesma cápsula, mas adelgaçada, que reveste a célula-mãe. Convém recordar que a continuidade entre a célula-mãe e as células filhas permanece durante um tempo brevíssimo, pois as segundas se destacam da primeira, via de regra, quando ainda são pequeníssimas. Todavia, a união entre elas foi vista também por outros observadores, e reproduzida em ilustração do trabalho de REDAELLI & CIFERRI (2). Na maioria dos casos as células filhas são esferóides; porém, podem ser baciliformes, como foi ilustrado por ALMEIDA, ou também piriformes.

6) Células com diâmetro de 6 até 20μ podem-se subdividir por brotamento simples. Porém, embora raramente, também se podem multiplicar por este processo elementos menores de 6μ ou maiores de 20μ (figs. 17 - 27).

Em um ponto qualquer da célula nasce um broto, constituído por protoplasma e substância cromatínica da célula-mãe. Nas células em gemação a cromatina se dispõem em blocos, ora maiores ora menores, dos quais contei um máximo de seis. Via de regra não

são iguais um ao outro. Além de terem, frequentemente, volume diferente, alguns se coram em rosa claro, outros em vermelho escuro. Nestes últimos, via de regra, não se distingue estrutura, enquanto que, nos primeiros, às vezes se percebe uma fina rede corada em vermelho mais escuro. Não é raro surpreender-se a substância cromatínica passando da célula-mãe à célula filha, como demonstram as figuras 17-19. Estes aspectos ilustram de modo absolutamente claro que o processo de multiplicação destas células é o do brotamento. Deve ser salientado que, nestas células, nunca se encontra aquele processo de adelgaçamento da cápsula que foi descrito no parágrafo 5, e que é característico do brotamento múltiplo. Por estas razões, e para distinguir um do outro os dois modos de reprodução, convencionei chamar este último processo de brotamento simples, para indicar que, aparentemente, não é precedido por aquelas profundas modificações nucleares que precedem a gemulação múltipla.

O brotamento simples pode-se dar só em um polo da célula-mãe, ou então em vários pontos ao mesmo tempo.

A célula filha, antes de se destacar da célula-mãe e de se tornar independente, pode, por sua vez, dar origem, por brotamento, a outra ou a outras células. Formam-se assim, nos tecidos humanos retirados do vivo, cadeias sempre muito curtas. No cadáver, pelo contrário, e também no pús do testículo das cobaias, podem formar-se cadeias simples ou ramificadas bastante compridas e constituídas por várias dezenas de células. As células em brotamento podem ser esféricas ou esferóides e mais ou menos alongadas, ou ovóides, elipsóides, piriformes, às vezes tendentes à forma quadrangular. O pedúnculo que une a célula filha à célula-mãe via de regra é muito curto e delgado; porém, embora pouco frequentemente, pode ser bastante comprido.

7) O sétimo tipo se refere a células esféricas ou esferóides, ou ainda a elementos apresentando um forte estrangulamento central ou excêntrico. A substância cromatínica é difusa, ou então subdividida em inúmeros e minúsculos grânulos, às vezes como uma verdadeira e finíssima poeira (fig. 29). Não tenho elementos para estabelecer a significação destas células e suas relações com as outras. Nem si se trata de elementos em divisão direta, ou então em conjugação.

8) Também o estudo das preparações por aposição parece mostrar que as células em forma de concha (ditas caliciformes), ou melhor, aquelas que apresentam uma depressão em um polo, via de re

gra não são células degeneradas ou mortas. Elas contém protoplasma e substância nuclear que se apresentam sob os mesmos aspectos descritos nos parágrafos precedentes. Elas podem nascer já com essa forma e, uma vez alcançado um certo volume, entrar em divisão, seja mediante o brotamento simples, seja mediante a gemulação múltipla, dando origem ou a células filhas esféricas ou baciliformes, ou ainda a células deprimidas em um polo, iguais, portanto, à célula-mãe.

Até agora, não se possuem elementos para uma interpretação destas curiosas células.

9) As células alteradas ou mortas distinguem-se facilmente das outras porque a cápsula é encarquilhada, ou angulosa, enrolada, achatada, fragmentada. Devido a estes aspectos elas se diferenciam bem dos elementos ditos baciliformes, dos quais se falou há pouco.

É interessante o comportamento da cápsula das células em gemulação múltipla, após o esgotamento de seu conteúdo e a morte da célula. Este comportamento, segundo consta, não foi ainda descrito; ele pode ser seguido com facilidade no material tratado pela prata amoniacal mas não pode ser estudado nas preparações coradas.

Uma vez vazia, a cápsula sofre evidentemente a pressão dos tecidos circunstantes, pois acaba se deformando e se achatando. Contemporaneamente se fragmenta. As linhas de fratura partem dos orifícios da cápsula que restaram da saída das gémulas; percorrendo uma linha reta alcançam outro pertuíto, e assim por diante. Raramente passam entre um orifício e o outro. Os fragmentos de uma cápsula podem ser numerosos e minúsculos.

A cápsula das outras células, pelo contrário, ou seja daquelas que não se reproduzem pelo processo da gemulação múltipla, dificilmente se fragmentam. Encarquilham-se ou enrolam-se, mas permanecem inteiras, possivelmente durante um tempo bastante longo.

Até agora, não se possuem elementos para determinar precisamente quanto tempo as cápsulas das células mortas podem permanecer nos tecidos, e quais as reações teciduais que porventura produzam. É muito comum encontrá-las em tecidos com estrutura granulomatosa tuberculóide gigantocelular, mas evidentemente não se pode estabelecer se esta estrutura deve ser interpretada como uma reação à própria cápsula, a qual deste modo agiria simplesmente como um corpo estranho, ou então, se ela foi determinada pelas substâncias derivadas da desintegração do fungo; e, neste caso, outra seria a significação do granuloma tuberculóide.

Devo registrar aqui que encontrei cápsulas vazias no tecido cicatricial resultante da reparação de gânglios linfáticos parasitados, supurados e coliquados. Nestes casos, e são dois de minha observação, um dos quais tratado pelas sulfas, a cápsula das células do fungo tanto se podia encontrar em pleno tecido cicatricial, sem sinais de reação inflamatória atual, como dentro de pequenos granulomas tuberculóides, por sua vez circundados de conjuntivo cicatricial, os quais davam a impressão de estar em via de regressão e extinção. Isto pareceria indicar que a reação "de corpo estranho" provocada pela cápsula das células do fungo era escassa e incapaz de determinar uma inflamação granulomatosa de tipo tuberculóide. Porém, as observações a respeito até agora são escassas, e por isso não é ainda possível emitir um juízo sobre o assunto. Aqui me limito, pois, a registrar o fato observado.

Igualmente, não se sabe ainda como se processa a eliminação das cápsulas vazias.

10) Tanto nas preparações após inclusão, como nas obtidas por aposição encontram-se células grandes ($20-30\mu$) perfeitamente esféricas (fato este que pareceria indicar que a cápsula encerra um conteúdo capaz de resistir à pressão do tecido circunstante, e portanto que a célula é viva), muito refringentes à luz. A cápsula não somente é refratária aos corantes, como também não se deixa atravessar por eles. Portanto, fica obscura a estrutura íntima destes elementos. É possível que se trate de formas de resistência.

* * *

A frequência da multiplicação por gemação simples ou por gemulação múltipla varia de caso para caso. Embora na maioria dos exemplares por mim estudados se encontrem ambas, parece-me que, via de regra, a gemação simples é mais frequente nos tegumentos, especialmente se são ulcerados, preponderando a gemulação múltipla nos gânglios linfáticos.

Como é sabido, em seus primeiros trabalhos HABERFELD (29) tinha afirmado que o agente da moléstia de Lutz só se reproduz, nos tecidos, por esporulação. Por isso o tinha denominado de *Zymonema histosporocellularis*, negando peremptoriamente a observação de VIANNA (30), segundo o qual o fungo podia reproduzir-se por dois mecanismos diferentes: ou seja, por esporulação e por brotamento.

Ulteriormente, porém, (1919), HABERFELD (31) corrigiu a sua primeira asserção. De fato, no escarro sanguineo-purulento de um húngaro residindo no Brasil havia 20 anos, observou células do fungo as quais produziam brotos. Sentiu-se, portanto, autorizado a concluir que

“fica fora de dúvida que o cogumelo em questão se multiplica nos tecidos não somente por endosporos, mas também por brotos”.

A conclusão de HABERFELD talvez não era completamente fundamentada, pois não viu as células em brotamento nos tecidos, mas em um produto patológico, ou seja no escarro (ver, a este proposito, o que escrevi no primeiro trabalho sobre este assunto). Todavia, a observação de HABERFELD deve ser lembrada aqui pelas ilações que o A. tirou. Ou seja:

“como este último modo de reprodução foi descrito em certas úlceras tegumentares e no presente caso foi verificado também no escarro proveniente de lesões pulmonares, parece muito provavel que a formação de gemmas esteja ligada á presença de oxigenio em maior quantidade; não sendo verificavel no interior dos órgãos parenchymatosos onde é observada apenas a esporulação”.

As minhas observações demonstram que também nos gânglios linfáticos retirados do vivo e no pulmão, fígado, rim, etc. do cadáver se encontram formas em brotamento. Portanto, deve haver outra razão além daquela invocada por HABERFELD, que, no momento, escapa à análise.

É evidente que cada um dos tipos celulares descritos corresponde a uma fase do ciclo que o fungo desenvolve em sua vida parasitária. Reconstruir completamente este ciclo parece-me, porém, tarefa ainda impossível; pois, embora esta análise tenha mostrado com toda certeza a existência de formas celulares e de particularidades estruturais até agora não descritas, o estudo citológico é ainda incompleto. De um modo especial, deverá ser aprofundado o estudo das modificações que precedem a gemulação múltipla, assim como, talvez, o estudo dos elementos chamados de caliciformes. De qualquer modo, parece-me que, desde já, algumas afirmações podem ser feitas.

Tomando como ponto de partida as células pequenas (1 a 5μ), vemos que uma minoria delas se divide por gemação, enquanto a maioria cresce ainda. Estas últimas, alcançando um volume maior, podem

seguir dois caminhos. De fato, algumas continuam se dividindo por gemação ou brotamento simples; outras permanecem ainda isoladas, esféricas, enquanto sua cromatina entra em um movimento, possivelmente cariocinético, do qual resulta a formação de um número frequentemente muito grande de blocos. Após esta fase de preparação, durante a qual se sucedem também algumas modificações da cápsula celular, processa-se uma gemulação múltipla em toda a superfície da célula, conduzindo a um rápido esgotamento da mesma. As células filhas recomeçam o ciclo.

Este esquema, repito-o, é incompleto. Não se sabe se as células nascidas por brotamento simples se multiplicarão sempre mediante este processo ou se elas também, em um determinado momento de sua vida, poderão sofrer as íntimas modificações da cromatina que precedem a gemulação múltipla. Não se sabe se esta, e os fenômenos cromatínicos que a precedem, resultam de uma conjugação sexual. Em todo caso, parece-me que estas pesquisas, assim como aquelas feitas com os processos de impregnação pela prata amoniacal, tenham demonstrado que o ciclo parasitário, as formas do parasito nos tecidos humanos, e seu modo de reprodução, não são monomorfos e tão simples como geralmente se encontra registrado em livros e artigos especializados. Parece-me ter demonstrado, também que o processo fundamental de reprodução do fungo em sua vida parasitária é uma gemação, como MOORE (32) já tinha afirmado, embora sem descrever as particularidades da fina estrutura celular ilustradas neste e nos outros trabalhos (27 - 28). Ainda é cedo, talvez, para se fazer uma revisão da posição sistemática do *P. brasiliensis*; porém creio que, na escolha de qualquer classificação, devem ser tomados em consideração os fatos expostos acima.

RESUMO E CONCLUSÕES

Em dois trabalhos precedentes o A., usando sistematicamente a prata amoniacal em 54 casos de moléstia de Lutz, determinada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, 1929, poudemonstrar que algumas células do fungo, nos tecidos humanos retirados do vivo, se multiplicam por gemação. Estabeleceu, portanto, que não pode ser aceita a fórmula

zoosporangio $\rightleftharpoons$ criptosporos nús amebóides

com a qual geralmente é esquematizado o ciclo da vida parasitaria do *Paracoccidioides*.

Esta terceira nota tem por fim estudar os aspectos citológicos do fungo, ainda nos tecidos humanos retirados do vivo. A fina estrutura das células do fungo não pode ser analisado de um modo satisfatório nos cortes de fragmentos incluídos em parafina e corados por vários métodos (hematoxilinas; Masson e derivados; Gram e derivados; etc.). Resultados satisfatórios, e que permitem a observação de muitas particularidades estruturais não visíveis nos cortes histológicos, obtêm-se com as preparações por aposição (impressão), coradas com hematoxilina férrica segundo Heidenhain, ou com o Giemsa. Este último método se mostrou superior ao primeiro, pela constância dos resultados e pela fineza dos detalhes estruturais que evidencia. Quase todas as células do fungo se coram e podem ser estudadas nas lâminas por aposição tratadas com o Giemsa.

Com o método acima foram estudados sete casos. As preparações por aposição eram feitas imediatamente após a retirada do material (gânglios linfáticos, lesões cutâneas, etc.) por biópsia, tendo-se assim a certeza de que as formas do fungo observadas pertenciam ao ciclo parasitário, e não ao saprofítico. Os sete casos usados eram exemplares legítimos da moléstia de Lutz, pois de todos se obtiveram culturas, ou inoculações em cobaias com resultado positivo e com retro-culturas, conforme está esquematizado na Tab. I.

Os resultados da análise da fina estrutura das células do fungo encontram-se descritos no texto. O estudo das preparações por aposição confirma os resultados obtidos com o emprego da prata amoniaca, e demonstra que o processo fundamental da multiplicação não é uma esporulação (esporulação exógena; criptosporulação), mas uma gemação.

Nos tecidos retirados do vivo há duas formas de gemação. Na primeira chamada de simples (gemação ou brotamento simples), o brotamento não é precedido de transformações nucleares, as gemas são pouco numerosas e podem formar-se cadeias, às vezes ramificadas, via de regra bastante curtas. Na segunda, que é característica da espécie e a mais comum de se encontrar na fase parasitária do fungo, a gemulação se faz em toda a extensão da superfície celular (gemulação múltipla) e é precedida de profundas e complicadas modificações nucleares, cuja descrição se encontra no texto. Via de regra, as duas formas de gemação coexistem no mesmo órgão ou tecido. Porém, no material estudado pelo A., e que ascende a cerca de 60 casos, a gemação simples é mais frequente nos tegumentos, especialmente se ulcerados.

SUMMARY

THIRD CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE MORPHOLOGY OF THE CAUSAL AGENT OF LUTZ DISEASE IN HUMAN BODY

In two preceding papers the author, by the systematic use of ammoniacal silver in 54 cases of Lutz Disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, 1929, was able to demonstrate that some cells of the fungus, in human tissues taken from the living body, multiply by a process of gemmation. He therefore proved that we cannot accept the formula

zoospore $\rightleftharpoons$ naked ameboid cryptospores

which is generally employed to represent the cycle of the parasitic life of *Paracoccidioides*.

The aim of this third communication is the study of the cytological aspects of the fungus in human tissues taken from the living body. The delicate structure of the fungus cells cannot be satisfactorily studied in sections of fragments embedded in paraffin and stained by various methods (hematoxylin; Masson and derived methods; Gram and derived methods; etc.). But in preparations made by apposition and stained with Heidenhain's ferric hematoxylin or Giemsa, satisfactory results can be obtained as it is possible to observe many structural details which are not visible in histological sections. The latter method is superior to the former on account of the uniformity of the results obtained and by the fineness of the details shown. Nearly all the cells of the fungus take the stain and can be studied in slide preparations obtained by apposition and stained by Giemsa's method.

Seven cases were studied by the above mentioned method. The preparations by apposition were made immediately after obtaining the material (lymphatic glands; cutaneous lesions; etc.) by biopsy, so that one could be sure that the forms of the fungus observed belonged to the parasitic and not to the saprophytic cycle. The seven cases were legitimate specimens of Lutz Disease, for in all of them were made cultures or inoculations in guinea-pig with positive results and retrocultures, as shown in the table.

The results of the analysis of the fine structure of the fungus cells are described in the text. The study of the preparations made by apposition confirms the results obtained by the use of ammonia silver and shows that the fundamental process of multiplication is not sporulation (exogenous sporulation; cryptosporulation), but gemmation. In tissues taken from the living body there are two forms of gemmation. In the first, so-called simple gemmation or simple budding, the process is not preceded by nuclear transformation, the buds are not numerous and there may occur the formation of chains, sometimes ramified, but as a rule short. In the second form, which is characteristic of the species and is the one most commonly met with in the parasitic phase, the gemmation occurs over the whole cellular surface (multiple gemmation) and is preceded by profound and complex nuclear changes, which are described in the text. As a rule the two forms of gemmation co-exist in the same organ or tissue. However, in the material studied by the author (about 60 cases), simple gemmation is more frequent in the skin, especially when ulcerated.

AUTORES CITADOS

1. FONSECA, O. FILHO, 1939, Sobre o agente etiológico da granulomatose blastomicroide neotropical. *An. brasil. dermat. e sifilogr.*, 14: 85-111.
2. REDAELLI, P. & CIFERRI, R., 1937, Morfologia, biologia e posizione sistematica di *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida (Fam. *Paracoccidioidaceae*) con notizie sul granuloma paracoccidioidico. *R. Accad. d'Italia, Mem. Cl. Sci. Fis., mat. e nat.*, 8: 559-610.

3. LUTZ, A., 1908, Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Brasil Med.*, 22: 121-124; 141-144.
4. LUTZ, A., 1908, Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Imprensa Med., Rio de Janeiro*, 16: 151-163.
5. LUTZ, A., 1934, Coccidioides-Infection mit Lokalisation in der Mund-schleimhaut. Erste in Südamerika beobachtete Falle. Beitrag zur geschichte der Hyphoblastomycosis americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28: 585-601.
6. SPLENDRE, A., 1911, Blastomycoses americanas. *Braz. Medico*, 24: 153-157.
7. SPLENDRE, A., 1911, Bouba. Blastomycose. Leishmaniose. Nota sobre algumas affecções framböscicas observadas no Brasil. *Imprensa Med.*, 19: 1-7.
8. SPLENDRE, A., 1912, Zymonematosi con localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. *Bull. Soc. Path. exot.*, 5: 313-319.
9. SPLENDRE, A., 1912, Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribù degli exoascei (*Zymonema brasiliense*, n. sp.). *Vol. onore Prof. Angelo Celli*, Roma, Tip. Nazionale di G. Bertero e C.
10. CARINI, A., 1908, Um caso de blastomycose com localização primitiva na mucosa da boca. *Rev. med. S. Paulo*, 3: 120-122.
11. CARINI, A., 1912, Comunicação à Soc. de Med. e Cir. de S. Paulo. Sessão ordinaria de 1.º de Julho.
12. CARINI, A., 1915, Un cas de Blastomycose péritoneale à Coccidioides immitis. *Bull. Soc. Path. exot.*, 7: 711-715.
13. CARINI, A., 1915, Um caso de blastomycose peritoneal. *Ann. paulistas med. cir.*, 5: 142-144.
14. SOUZA CAMPOS, E. & ALMEIDA, F. P., 1927, Contribuição para o estudo das "Blastomycoses" (Granuloma coccidioides) observadas em São Paulo. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 2: 203-216.
15. ALMEIDA, F. P., 1929, Estudo sôbre o parasito do Granuloma coccidioidico. Nota previa. *Bol. Biol., Rio de Janeiro*, 16: 97-98.
16. ALMEIDA, F. P., 1929, Estudo comparativo do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 4: 91-98.
17. ALMEIDA, F. P., 1929, Aspectos histológicos dos casos de Blastomycose verificados em São Paulo. *Brasil med.*, 43: 485-489.
18. ALMEIDA, F. P., 1930, Em tórno do problema da blastomycose brasileira. *Bol. Soc. Méd. Cir. São Paulo*, 14: 373-383.
19. ALMEIDA, F. P., 1930, Différences entre l'agent étiologique du granuloma coccidioidique des Etats Unis et celui du Brésil. Nouveau genre pour le Champignon brésilien. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 105: 315-316.
20. ALMEIDA, F. P., 1930, Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo género para o parasito brasileiro. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 5: 125-139.
21. ALMEIDA, F. P., 1933, As blastomycoses no Brasil. *Ann. Fac. Med. Univ. São Paulo*, 9: 69-163.
22. ALMEIDA, F. P., 1933, Blastomycose em geral e sua classificação. Definição e classificação das Blastomycoses. *Rev. Ass. paulista med.*, 3: 270-277.
23. ALMEIDA, F. P., 1934, Le blastomicosi nel Brasile. *Folia Clin. e Biol., S. Paulo*, 6: 1-15.
24. ALMEIDA, F. P., 1935, Considerações em tórno dos agentes etiológicos das blastomycoses. *Ann. paul. med. cir.*, 29: 11-30.
25. ALMEIDA, F. P., 1936, Granuloma paracoccidioidico e sua localização bucal. *Rev. Otolaringol., S. Paulo*, 4: 679-682.

26. ALMEIDA, F. P., 1939, *Mycologia médica*. Co. Melhoramentos, São Paulo (cf. p. 398-441).
27. BOGLIOLO, L., 1945, Contribuição ao conhecimento da morfologia do agente da molestia de Lutz, em seu ciclo parasitário. Primeira nota. *Rev. Brasil. Biol.*, 5: 321-338.
28. BOGLIOLO, L., 1946, Contribuição ao conhecimento da morfologia do agente causal da doença de Lutz. Segunda nota. *Rev. Brasil. Biol.*, 6: 61-71.
29. HABERFELD, W., 1915, Blastomycose de localização abdominal e um caso desta molestia combinada com disenteria amoebiana. *Arch. Brasil. Med.*, 5: 107-114.
30. VIANA, G. DE OLIVEIRA, 1914, Doença de Posadas-Wernicke nas lesões apendiculares. Trabalho original apresentado à Faculdade de Medicina, a fim de habilitar-se á livre docência de Anatomia patológica. *Arch. Brasil. Med.*, 4: 446-474.
31. HABERFELD, W., 1919, Nova contribuição ao estudo da "Blastomycose" interna. *Rev. Med.*, 3: 5-7.
32. MOORE, M., 1938, LXXX. Blastomycosis, Coccidioidal granuloma and paracoccidioidal granuloma. Comparative study of north american, south american and european organisms and clinical types. *Arch. Dermatol. Syphil.*, 38: 163-190.



Figs. 1 e 2 — Células nascidas pelo processo de gemulação múltipla (A célula da fig. 1 é leishmani-forme). Figs. 3, 4, 5, 7, 8 — Células cuja cromatina se divide diretamente em blocos; preparam-se para a reprodução mediante o processo de brotamento simples. Figs. 6, 9, 10, 11, 12, 13 — Células com disposição filamentososa da cromatina. Figs. 14, 15, 16 — Células cuja cromatina, após as transformações ilustradas nas figs. 6 e 9 a 13, se divide em blocos; preparam-se para a gemulação múltipla; a cápsula está adelgada em muitos pontos, distribuídos regularmente na superfície celular. Figs. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 — Células em brotamento simples (nas figs. 17, 18 e 19 vê-se a cromatina passando da célula-mãe à célula filha). Fig. 28 — Célula nascida por brotamento simples. Fig. 29 — Célula apresentando um estrangulamento.

PESQUISAS DE CITOLOGIA QUANTITATIVA: O CRESCIMENTO INTERFÁSICO DAS ESPERMATOGÔNIAS NOS OFÍDIOS¹

GIORGIO SCHREIBER

Instituto Butantan, S. Paulo

(Com 3 figuras no texto)

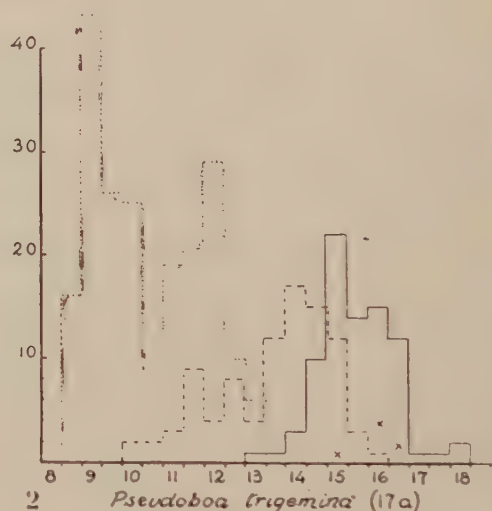
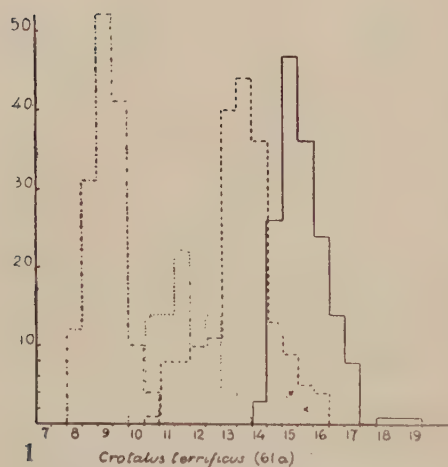
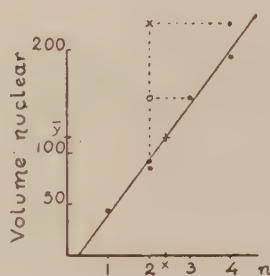
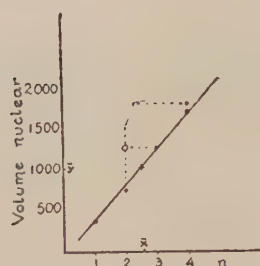
Em trabalhos anteriores (SCHREIBER & SCHREIBER, 1941; SCHREIBER, 1943) foram estudadas as variações volumétricas do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e larval e foram descritos alguns fenômenos quantitativos cuja interpretação necessita um maior conhecimento do crescimento nuclear durante a interfase. Foi outrossim frizada a necessidade de esclarecer de modo definitivo as relações entre o número de cromossômios, ou melhor, dos múltiplos do genoma haplóide e o volume nuclear. De fato, na literatura há certa confusão a este respeito, pois apesar de haver numerosas provas de uma correlação direta entre o genoma e o volume nuclear, há também alguns dados que relacionam o valor quantitativo de genoma à superfície do núcleo. Outros, enfim, (WERMEL) relacionam o volume com o quadrado do número de cromossômios, ou com fatores genéticos (DOBZHANSKY, WETTSTEIN). O exame crítico destes casos será feito num trabalho ulterior.

Achamos interessante, portanto, verificar esta relação em duas condições nas quais há valores múltiplos do genoma bem estabelecidos; isto é uma série de plantas poliplóides do Café (gentilmente fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas e cujos resultados serão publicados em breve) e na série espermatogenética. Nesta última, temos uma condição anatomica especialmente favorável ao estudo deste problema, pois no mesmo corte histológico apresentam-se

¹ Recebido para publicação a 21 de março de 1946.

Pesquisas realizadas com uma Bolsa dos Fundos Universitários.

contíguos os núcleos dos espermatócitos 1º, espermatócitos 2º e espermátídias, cujo valor é respectivamente de $4n$ - $2n$ - n , e os das espermatogônias com $2n$, mas em fases diferentes do ciclo mitótico (profase $4n$). Os valores volumétricos da série meiótica podem-se considerar assim como os marcos miliares no estudo da interfase gonial.



Em baixo: Histograma dos diâmetros nucleares do testículo (— spermatócitos 1.º; ---- espermatogônias; espermatócitos 2.º; -.-.-, espermátídias; (x) profases goniais). Em cima: Correlação entre valor múltiplo do genoma (N) e valor modal do volume nuclear (1N, espermátídias; 2N espermatócitos 2.º; 3N espermatogônias; 4N espermatócitos 1.º e (x) protases goniais). Fig. 1 — De *Crotalus terrificus* Laur.; fig. 2 — De *Pseudoboa trigemina* D. & B.

Limitamo-nos nesta nota ao estudo do crescimento interfásico do núcleo do ciclo mitótico das espermatogônias não considerando, por enquanto, o do auxócito, que será tratado em seguida.

O estudo estatístico-cariométrico dos elementos testiculares já foi feito por vários autores, seja nos Vertebrados, seja nos Insetos, desde as antigas pesquisas de JACOBI que pela primeira vez demonstrou o crescimento rítmico (descontínuo e proporcional) do núcleo. Apesar das pesquisas de JACOBI, HERTWIG, SAUSER, WERMEL e sua es-

cola, SPÜHLER, FREERKSEN e outros terem esclarecido correlação entre a redução do volume nuclear e a do genoma, poucas indicações existem acerca do núcleo das espermatogônias. A falta destas indicações é provavelmente devida ao fato de que as espermatogônias nem sempre têm núcleo bem esférico, como se dá com os outros elementos testiculares e mais ao fato de estarem as espermatogônias fora da série reducional, não apresentando portanto, interesse tão imediato no problema.

Notemos, porém, que as espermatogônias dos Ofídeos têm núcleos regularmente esféricos, exceto suas profases que são ligeiramente elipsoidicas.

Nas presentes pesquisas, como já dissemos, achamos importante determinar as variações volumétricas do núcleo espermatogônico, justamente por ser este um elemento em atividade mitótica normal junto com os outros da série meiótica, cujas medidas têm relações bem evidentes com as variações quantitativas do genoma. Uma vez evidenciadas estas variações, teremos a possibilidade teórica de julgar ou apreciar o que se passa no genoma espermatogônico pelo menos do ponto de vista quantitativo, durante a interfase mitótica.

Para estas pesquisas aproveitamo-nos do rico material ofiológico que chega continuamente ao Instituto Butantan, na estação de reprodução de Setembro-Novembro de 1945. Foram estudadas 8 espécies entre Crotalídeos e Colubrídeos: *Crotalus terrificus terrificus* Laur., *Bothrops jararaca* Wied, *Driophylax pallidus* L., *Xenodon merremi* Wagler, *Pseudoboa trigemina* D. & B., *Philodryas schottii* Schlegel, *Philodryas olfersii* Lichtenst., *Tomodon dorsatus* D. & B., às vezes em vários exemplares de cada espécie.

Em cada indivíduo foi medido o volume nuclear das espermatogônias, dos espermatócitos 1º, dos espermatócitos 2º, e das espermatídias. Os espermatócitos 1º, só na fase final de paquítenos até a diacinese. As medidas foram executadas mediante desenho em câmara lúcida de ao menos 100 núcleos de cada tipo e determinado o diâmetro médio dos dois diâmetros maior e menor do desenho. Com estes dados foram construídas as curvas de frequência dos diâmetros e destas determinado o valor modal. Este valor modal foi transformado em volume e com estes volumes foi construído o diagrama entre volume e número de cromossômios. Deste diagrama foi calculada a equação de regressão e o erro de estimação S_y .

Deixamos para o trabalho em extenso, que será publicado nas Memórias do Instituto Butantan, a discussão sobre o valor teórico e a literatura sobre o método usado. Lembramos aqui somente que nestas medidas os resultados são ótimos para todos os núcleos perfeitamente esféricos como os das espermatogônias, espermatócitos 2 e espermatídias ao passo que para núcleos elipsóidicos como os dos esper-

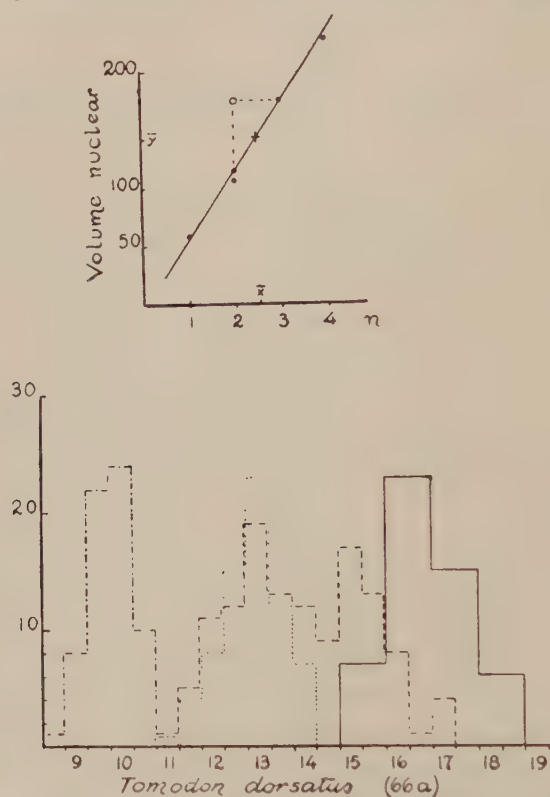


Fig. 3 — Histogramas dos diâmetros nucleares do testículo de *Tomodon dorsatus* D. & B. e correlação entre genoma e volume nuclear (Explicação como nas figs. anteriores).

matócitos 1º e as profases das gônias obtivemos resultados ligeiramente superiores aos teóricos. A falta de orientação destes elipsóides, porém, não permite outra escolha.

A escolha do valor modal como parâmetro representativo das curvas de frequência obedece ao critério geral destas pesquisas cariométricas, e já foi discutido em trabalho anterior (1941 e 1943). Acha-mos, porém, útil repetir aqui rapidamente este critério: numa população de núcleos, cuja variabilidade é determinada além da variabilidade flutuante individual, também por um fator de crescimento, os valores volumétricos que se apresentam com maior frequência são

aqueles em que o núcleo permanece por um tempo maior. As modas das curvas de freqüência representam, portanto, etapas do crescimento. A realidade deste conceito foi verificada pelas pesquisas da escola de WERMEL sobre o crescimento do núcleo interfásico das células cultivadas *in vitro* com o método cinematográfico.

No trabalho definitivo serão dadas as indicações e os cálculos referentes a todos os casos examinados, além de outros, referentes a outras espécies animais e em período de desenvolvimento diferente (embrião). Aqui limitamo-nos a dar os valores volumétricos das 8 espécies e a ilustrar três destas escolhidas entre as outras por apresentarem bem evidentes as diversas fases do ciclo mitótico espermatogonial. As figuras 1, 2 e 3 mostram para cada caso as curvas de freqüência dos elementos testiculares e o diagrama de correlação entre volume nuclear e múltiplos do genoma haplóide. Estas figuras mostram com a maior evidência e desnecessitam por completo qualquer comentário, a perfeita correlação entre as variações do genoma e do volume nuclear na série meiótica. As espermatogônias, pelo contrário, consideradas como elementos diplóides, apresentam um volume muito maior e absolutamente discordante do seguramente diplóide dos espermatócitos segundos. No diagrama este valor discordante na abscissa $2n$ das gônias foi indicado com um círculo vazio. Em todos os casos estudados (Tab. I) *e sem exceção nenhuma, o volume nuclear das espermatogônias corresponde ao valor triplo do genoma haplóide, e foi indicado no diagrama com um ponto preto na mesma ordenada do ponto vazio supra mencionado. Se nós tivéssemos diagramado as espermatogônias como triplóides, teríamos verificado a perfeita concordância com os valores da série meiótica e, aliás, foi assim que foi calculada a equação de regresso e o erro de estimação ($\bar{S}_y$).*

O cálculo deste último foi aplicado justamente para verificar se o afastamento do valor volumétrico da espermatogônia relativamente ao volume do espermatócito segundo é estatisticamente significativo. Esta significância verifica-se praticamente em todos os casos (sendo em 5 casos a diferença entre o volume da gônia e do cito 2° maior do que 3 vezes $\bar{S}_y$ e em 4 casos, maior do que 2 vezes, ao limite ou apenas ligeiramente inferior a 3 vezes)

Em todos os casos em que foi possível medir o volume das profases gonais, estas têm um valor exatamente tetraplóide, coincidindo bastante bem com o valor volumétrico dos espermatócitos primeiros. Estes dados, indicados no diagrama com um (x) em correspondência

TABELA I

Valores modais dos volumes nucleares.

N°	ESPÉCIE	N	2N	2N 2N x 1,5	2N x 2	4N
		ide	cito 2.º	gonia	profase gonia	cito 1.º
1	<i>Phylodryas schottii</i>	324	701	1018	—	1760
15	<i>Phylodryas schottii</i>	380	705	1018	—	1597
17	<i>Pseudoboa trigemina</i>	442	845	900 1544	2110	1942
19	<i>Xenodon merremi</i>	449	805	1288	—	2132
27	<i>Dryophylax pallidus</i>	522	950	1436	—	1931
47	<i>Bothrops jararaca</i>	390	852	1294	1950	1781
61	<i>Crotalus terrificus</i>	386	782	1270	1900	1785
65	<i>Xenodon merremi</i>	384	905	1288	1950	1953
66	<i>Phylodryas olfersi</i>	406	764	1122	1530	1750
68	<i>Tomodon dorsatus</i>	588	1071	1147 1767	—	2286

Nota: As medidas são dadas em milímetros à ampliação do desenho. Cada mm. corresponde a 5,3 micra.

à abscissa $2n$ e depois levado até à $4n$ para mostrar a coincidência, não foram considerados no cálculo da equação de regressão por serem poucos e bastante variáveis por terem os núcleos nesta fase geralmente a forma elipsóide.

Além disso, em alguns casos as espermatogônias apresentam uma curva de frequência perfeitamente bimodal sendo uma das modas perfeitamente coincidente com o valor diplóide (como é geralmente encontrado nos mamíferos pelos já citados autores) e a outra com o triploide (ou seja uma vez e meia a do diplóide) (fig. 3, *Tomodon dorsatus*). Temos, assim, a possibilidade de colocar os valores volumétricos das diferentes fases do crescimento gonial em correspondência com os valores volumétricos de núcleos cujo valor múltiplo do genoma haplóide é perfeitamente estabelecido.

Devemos, portanto, concluir que na variação volumétrica do ciclo interfásico das espermatogônias dos ofídeos existe uma etapa de crescimento em correspondência com um valor triplo do genoma haplóide. Esta etapa, aliás, é aquela na qual a espermatogônia se apresenta mais frequente em todas as espécies examinadas.

A interpretação do significado desta etapa, nos parece ser de notável valor para o conhecimento dos fenômenos interfásicos.

Em trabalho anterior (1943) ilustramos vários casos da literatura e originais (HERTWIG, WERMEL, FISCHER, BRUMMELKAMP, SCHREIBER & SCHREIBER, etc.,) de valor volumétrico nuclear intermediário entre as etapas de duplicação e frisamos que o conhecimento exato do algarismo deste valor intermédio seria necessário para dar uma explicação razoável. De fato, tanto BRUMMELKAMP, como HERTWIG acham este valor igual a 1,41 (ou seja a raiz quadrada de 2) dando interpretações que já criticamos anteriormente, ao passo que outros autores (WERMEL, BOGOJAWLENSKY, e SCHREIBER 1943) consideram o valor intermediário igual a 1,5. A diferença entre os dois valores é relativamente pequena e estatisticamente é praticamente impossível escolher o valor real. A interpretação que se nos depara como a mais razoável (e que aliás foi já avançada por HEIDENHAIN para os valores achados por JAKOBI) é que nos núcleos de volume intermediário entre as etapas de duplicação (isto é, os de valor $3n$) um dos dois genomas haplóides, seja duplicado precocemente em relação ao outro. Verificando-se a estrita correlação entre o valor do genoma e o volume nuclear, que confirmamos nestas pesquisas pelos elementos da série meiótica, o volume da espermatogônia nesta fase terá alcançado valor 1,5 vezes o precedente e portanto igual ao de um núcleo triploide.

Esta fase transitória, que não podemos chamar triploide por não termos a possibilidade de verificação citológica no núcleo interfásico, foi indicada no trabalho anterior com o termo de "sesquifase" (de "sesqui", uma vez e meia, lat.)

A diferente velocidade de duplicação dos dois genomas haplóides, embora possa parecer um fato um pouco heterodoxo, não é um fenômeno totalmente novo. Lembramos somente o caso das células poliplóides do intestino de larvas de *Culex* estudado por HOLT. Aqui a multiplicação dos cromossomos é diferente nos membros de cada par, sendo um deles multiplicado precocemente ou repetidamente em relação ao outro. Têm-se assim células poliplóides com um núme-

ro de cromosômios múltiplo de 9 em lugar de múltiplos de 6 que é o valor diplóide da espécie. É pertinente lembrar que nas células intestinais poliplóides de outra espécie de mosquito (*Anopheles*) BOGOJAWLENSKY encontrou em pesquisas kariométricas classes de volumes com relações entre si de 1,5. Outros casos de comportamento diferencial dos dois genomas haplóides verificam-se em outras fases do ciclo mitótico ou meiótico e já foram por nós analisados no trabalho anterior (heteropiconose na meiose atípica dos Coccídeos, eliminação específica de parte dos cromosômios paternos em *Sciara*, isolamento total dos dois genomas em núcleos distintos na gonomeria, no ciclo da *Ameba diploidea* e nos Basidiomicetes) mas estes são menos evidentes por abranger fases diferentes do ciclo nuclear daquela que estamos estudando e por serem também exceções raras.

Achamos, porém, que outras explicações poder-se-iam dar ao valor, " $3n$ " da etapa volumétrica intermediária na interfase gonial. É conhecido que, às vezes, os elementos da série espermatogênética têm núcleos politênicos (cromosômios com mais de um cromonema). Este fato foi verificado por HERTWIG no homem, no gato e em condições experimentais no rato, e por SPUHLER no *Nycticebus*, e nos invertebrados por HUGUES SCHRADER (Coccídeos).

Nestes casos, geralmente, verifica-se uma terceira divisão na espermatogênese e o intervalo volumétrico entre os espermátócitos 1º e a espermatídia é de 8:1 em lugar de 4:1 como nos casos normais. Além disso, PAINTER e colaboradores verificaram a estreita correlação entre o volume nuclear e o valor politênico dos cromosômios nas pesquisas kariométricas sobre células neoplásicas. Assim, se pensamos que em cada cromosômio, metade dos cromonemas duplica-se durante a interfase antes da outra metade e sincronicamente em todos os cromosômios, teremos um estágio "sesqui" em cada cromosômio o que dará a situação volumétrica que verificamos. Voltaremos em seguida, no trabalho *in extenso*, sobre esta interpretação que se parece conformar melhor com outros fenômenos kariométricos encontrados nos Ofídeos, ainda em estudo e que poderia ser suscetível de ulteriores considerações teóricas.

Uma terceira explicação poder-se-ia levantar, sempre limitada à correlação entre genoma e volume nuclear: que do número total de cromosômios, uma metade ao acaso se multiplique sincronicamente e precocemente em relação a outra metade. Parece-me, toda-

via, não ter esta interpretação base nenhuma, nem genética, nem fisiológica.

Achamos bastante interessante o fato de esta "sesquifase" ter-se verificado no ciclo mitótico gonial como fenômeno constante em todas as espécies consideradas e com valores estatisticamente significantes. Esta generalização da sesquifase adquire, portanto, um valor mais profundo. De fato, nas pesquisas precedentes a "sesquifase" foi assinalada na comparação entre núcleos de tecidos embrionários ou patológicos ou na comparação entre núcleos de tecidos pertencentes a indivíduos e até espécies diferentes.

Na presente pesquisa pelo contrário, a comparação é feita entre núcleos do mesmo tecido, em ativa reprodução e portanto rigorosamente homólogos. Os resultados são perfeitamente confrontáveis com os das pesquisas feitas sobre as células cultivadas "in vitro" (WERMEL). As explicações prospectadas para esta fase da intercinese, estão aqui baseadas exclusivamente na rigorosa correlação entre as variações quantitativas do genoma e do volume nuclear e não requerem, portanto, nenhum hipotético fator fisiológico de correlação entre genoma e superfície, como admite HERTWIG, nem nenhuma aproximação matemática como admite arbitrariamente BRUMMELKAMP.

A existência desta etapa no crescimento interfásico do núcleo deve ainda ser considerada na avaliação crítica das pesquisas cariométricas, pois nem sempre, como tivemos ocasião de observar mesmo aqui, estão na mesma fase e este fato pode determinar as discrepâncias entre dados cariométricos somente verificados.

Não estamos ainda capacitados a escolher entre as interpretações prospectadas, porém, elas, e outras eventuais que se poderiam imaginar, dão a oportunidade de considerar esta etapa como um índice das modificações quantitativas do genoma durante a interfase.

SUMMARY

Continuing the preceeding researches on nuclear size, the Author studied the nuclear volume in the spermatogenesis (interphasic spermatogonia, 1st and 2nd spermatocyte, and spermatocyte) in 8 species of brasilian snakes (*Colubridae* and *Crotalidae*).

The caryometric — statistical method was used according to JACOBI, HERTWIG, WERMEL etc.; modal values of volume were calculated from the frequency curves of diameters and plotted against the chromosome number of each spermatogenetic stage. The regression line and the "standard error of estimate"

(Sy) were calculated and the statistical significance of the observed differences, verified.

The volume of the 1st spermatocyte, 2nd spermatocyte and spermatocyte are strictly correlated with the corresponding multiple value of the genome while the spermatogonia, in all the species studied, corresponded always to the threefold of haploid.

Those facts show firstly, the strict relation between nuclear volume and the quantitative value of the genome, and secondly, the existence of the "intermediate stage" of 1.5 times, during the rhythmical growth of the nucleus as previously studied in embryonic tissues by the Author.

The spermatogonia presents also in some individuals a second modal value corresponding to the volume of the diploid nucleus, and in all cases, the gonial prophase is of tetraploid size. It is therefore evident that during the gonial mitotic cycle the nucleus passes rhythmically from the diploid value of volume to that of the tetraploid prophase, having a relatively long rest at the triploid volume.

These facts can be interpreted in the following different ways:

1) half the diploid number of chromosomes (indistinctly) duplicates before or more rapidly than the other half;

2) all the chromosomes of one haploid set duplicate synchronously and with more or less different velocity in comparison with the ones of the other set;

3) if the nuclei are polytenic, in all the chromosomes one half of the chromonemata duplicates before the other half.

All these cases would lead to the same effect: the transitory triploid value of the volume as found here. This stage has been defined in the previous work of the Author as "sesquiphase" (from latin "sesqui" — one and a half).

The second interpretation seems to be supported by some other cytological observations but also the 3rd one appears to be of some interest and susceptible of development.

BIBLIOGRAFIA

- BIESELE J. J., POYNER, H. & PAINTER, T., 1942, *Nuclear phenomena in mouse cancers*. University of Texas Publ. N° 4243.
- BOGOJAWLENSKY K. S., 1935, Studien ueber Zellengrösse und Zellenwachstum. XI. Mitt. Ueber Beziehung zwischen Struktur und Volumen des somatischen Kerne bei Larven von *Anopheles Maculipennis*. *Z. Zellf. mikr. Anat.*, 22: 47
- BRUMMELKAMP, R., 1939, Das sprungweise Wachstum der Kernmasse. *Acta Neerl. Morphol.*, 11 (2): 177-187.
- FREERKSEN, E., 1933, Ein neuer Beweis für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergleichende volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen vom Meerschweinchen und Kaninchen. *Z. Zellf. mikr. Anat.*, 18:
- HERTWIG, G., 1933, Die dritte Reifeteilung in der Spermatogenese des Menschen und der Katze. *Z. Mikr. anat. Forschung.*, 87:
- HERTWIG, G., 1938-39, Abweichungen von dem Verdoppelungswachstum der Zellkerne und ihre Deutung. *Anat. Anz.*, 87: 65-73.

- HOLT, C., 1917, Multiple complexes in the alimentary tract of *Culex pipiens*. *J. Morphol.*, 29: 607.
- HUGUES SCHRADER, S., 1940, The meiotic chromosomes of the male *Llaveiella taenochina* Morrison (Coccidea) and the question of the tertiary split. *Biol. Bull.*, 78: 312-337.
- JACOB, W., 1926, Die Kerngrössen der männlichen Geschlechtszellen beim Säugetier in Bezug auf Wachstum und Reduktion. *Z. Anat. Entw. gesch.*, 81 (5/6): 563.
- SCHREIBER, G., 1941, Discontinuous and proportional decreasing of nuclear size in the liver of tadpoles during development and metamorphosis. *Anat. Record*, 87 (4) (Abstract Suppl. Amer. Soc. Zool.).
- SCHREIBER, G., 1943, O volume do núcleo durante o desenvolvimento embrionário e na interfase. *Rev. Agric.*, 18 (11-12): 458-474.
- SCHREIBER, G. & SCHREIBER, M., 1941, Diminuição rítmica do volume nuclear no fígado e no pâncreas dos girinos de Anuro. *Boll. Fac. Filos. Cien. Letr. Univ. São Paulo*, XXII *Zoologia* (5): 234-246.
- SPÜHLER, O., 1936, Genitalzyklus und spermiogenese der Mausmaki (*Nicticebus murinus* Mull) *Z. Zellf. mikr. Anat.*, 23 (4): 442.
- WERMEL E. & PORTUGALOW, W. W., 1935, Studien ueber Zellenwachstum und Zellengrösse. XL. Mitt. Ueber d. Nachweis des Rhythmischen Zellenwachstum. *Z. Zellf. mikr. Anat.* 22 : 133.

BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA Teste cutâneo com Coccidioidin¹

OSCAR VERSIANI

Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, Minas Gerais

Posto que para alguns não mais se admitam dúvidas quanto às diferenças existentes entre as três entidades clínicas que se denominam granuloma coccidióidico ou doença de Posadas — Wernicke, blastomicose americana ou doença de Gilchrist e blastomicose sul-americana ou doença de Lutz, para outros, entretanto, dúvidas existem a respeito, levantando-se controvérsias que muito têm concorrido para confundir os menos afeitos aos estudos micológicos.

Para contribuir ao esclarecimento dessa questão, como anteriormente anunciámos (6), traçamos um plano de investigações que envolvem a verificação do comportamento dos testes cutâneos, utilizando antígenos em reações cruzadas. Prevíamos a superveniência de reações de grupo e, portanto, inespecíficas, dificultando ou, quiçá, anulando qualquer possibilidade de diferenciação. Ainda assim, porém, iniciamos o trabalho, de cujos primeiros resultados damos agora notícia.

A especificidade do teste cutâneo com Coccidioidin na coccidioidomicose ou doença de Posadas-Wernicke tem sido largamente comprovada por pesquisadores americanos, entre os quais se podem citar KESSEL (4), FARNES (2), e SMITH (5), de tal forma que uma intradermo reação positiva com esse antígeno significa sempre infecção atual ou sensibilização pregressa pelo *C. immitis*.

Na blastomicose americana ou doença de Gilchrist os testes cutâneos, com filtrados de cultura de *B. dermatitidis* têm sido igualmente usados.

Também na blastomicose sul-americana, a intradermo reação

¹ Recebido para publicação a 10 de abril de 1946.

Trabalho da cadeira de Clínica das Doenças Infectuosas e Tropicais.

QUADRO I

Número	Data	NOME	título diluição	- Em 24 horas -			- Em 48 horas -			- Em 72 horas -			Observações
				Diâmetro em mm.	Aspecto		Diâmetro em mm.	Aspecto		Diâmetro em mm.	Aspecto		
1	11-8-45	H.F.	1/1000 1/100	0	Picada da agulha		0	Picada da agulha		0	Picada da agulha		
2	11-2-45	F.R.	1/1000 1/100	0	"	"	0	"	"	0	"	"	
3	11-2-45	P.R.	1/1000 1/100	0	"	"	0	"	"	0	"	"	
4	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	0	"	"	0	"	"	0	"	"	
5	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	2,3	Discretíssimo eritema endurcido eritema bem marcado		0	"	"	0	"	"	
6	3-3-45	J.R.	1/1000 1/100	—	Discreto eritema		—	Discreto eritema		0	"	"	
7	3-3-45	B.C.	1/1000 1/100	4,3	Pápula endurcida		0	"	"	0	"	"	
8	3-3-45	S.O.	1/1000 1/100	2,3	"		0	"	"	0	"	"	
9	3-3-45	F.G.R.	1/1000 1/100	0	Picada da agulha		0	"	"	0	"	"	
10	3-3-45	F.G.R.	1/1000 1/100	0	"		0	"	"	0	"	"	
11	3-3-45	F.G.R.	1/1000 1/100	0	"		0	"	"	0	"	"	
12	3-3-45	J.U.R.	1/1000 1/100	6,6	Discreto eritema endurcido		3,3	Discretíssimo eritema		0	"	"	
13	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	7,7	"		3,0	"		0	"	"	
14	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	7,7	Eritema maculoso		4,0	Discreto eritema		0	"	"	
15	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	6,0	" endurcido		3,6	Discretíssimo eritema		0	"	"	
16	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	8,4	Pápula eritematosa		3,6	"		0	"	"	
17	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	8,0	"		3,8	"		0	"	"	
18	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	0,0	Discreto eritema		0	Picada da agulha		0	"	"	
19	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	2,0	"		0	"		0	"	"	
20	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	6,6	"		5,0	Eritema		3,4	Discreto eritema		
21	3-3-45	P.R.	1/1000 1/100	5,2	"		3,6	"		2,5	"		
22	3-3-45	J.G.R.	1/1000 1/100	5,7	"		3,0	Discreto eritema		0	Picada da agulha		
23	3-3-45	J.G.R.	1/1000 1/100	5,7	"		2,7	"		0	"		
24	3-3-45	L.D.	1/1000 1/100	3,6	"		3,4	"		0	"		
25	3-3-45	L.D.	1/1000 1/100	5,2	"		2,8	"		0	"		
26	3-3-45	C.R.R.	1/1000 1/100	5,7	"		3,5	"		0	"		
27	3-3-45	C.R.R.	1/1000 1/100	5,7	"		4,7	"		0	"		
28	3-3-45	E.K.	1/1000 1/100	5,8	Pápula eritematosa		3,7	"		0	"		
29	3-3-45	E.K.	1/1000 1/100	4,2	Discreto eritema		0	Picada da agulha		0	"		
30	3-3-45	E.K.	1/1000 1/100	2,5	"		0	"		0	"		
31	3-3-45	E.K.	1/1000 1/100	2,3	"		0	"		0	"		
32	3-3-45	H.F.	1/1000 1/100	3,3	Pápula eritematosa		3,0	Área equimótica		4,0	Área equimótica		
33	3-3-45	H.F.	1/1000 1/100	5,7	Eritema endurcido		2,8	Discretíssimo eritema		2,4	Discretíssimo eritema		
34	3-3-45	H.F.	1/1000 1/100	3,1	Discreto eritema		0	Picada da agulha		0	Picada da agulha		
35	3-3-45	H.F.	1/1000 1/100	1,0	Discreto eritema		2,0	Discreto eritema		0	"		
36	3-3-45	J.S.R.	1/1000 1/100	7,3	Pápula eritematosa		4,5	"		0	"		
37	3-3-45	J.S.R.	1/1000 1/100	5,8	Discreto eritema endurcido		3,7	Discretíssimo eritema		0	"		
38	3-3-45	J.S.R.	1/1000 1/100	2,7	Pápula eritematosa		0	Picada da agulha		0	"		
39	3-3-45	J.S.R.	1/1000 1/100	6,8	"		4,2	Discretíssimo eritema		0	"		
40	3-3-45	P.P.	1/1000 1/100	3,3	Discretíssimo eritema		0	Picada da agulha		0	"		
41	3-3-45	P.P.	1/1000 1/100	3,0	Eritema		0	"		0	"		
42	3-3-45	P.P.	1/1000 1/100	4,7	Discreto eritema		0	"		0	"		
43	3-3-45	P.P.	1/1000 1/100	4,2	"		0	"		0	"		
44	3-3-45	P.P.S.	1/1000 1/100	3,3	"		4,0	Discreto eritema		0	"		
45	3-3-45	P.P.S.	1/1000 1/100	3,7	"		4,0	"		0	"		
46	3-3-45	M.S.B.	1/1000 1/100	6,6	Eritema lig. endurcido		3,4	"		0	"		
47	3-3-45	M.S.B.	1/1000 1/100	7,0	"		3,6	"		0	"		
48	3-3-45	M.S.B.	1/1000 1/100	7,5	Discreto eritema endurcido		6,7	Discreto eritema endurcido		4,5	Discreto eritema endurcido		
49	3-3-45	M.J.S.	1/1000 1/100	8,0	"		7,0	"		3,7	"		

tem sido objeto de estudo, desde que FONSECA & AREA LEÃO (3) ensaiaram o antígeno que prepararam, servindo-se de culturas do agente causal da doença de Lutz àquele tempo ainda considerado pelos autores como o próprio *C. immitis*.

ALMEIDA & LACAZ (1), por sua vez, usaram um antígeno que denominaram Paracoccidioidina, conseguindo resultados positivos que consideraram de valor para o diagnóstico do granuloma paracoccidióidico, como assim denominam a doença de Lutz.

Nossas pesquisas iniciaram-se pela verificação do teste cutâneo com Coccidioidin em pacientes com blastomicose sul-americana.

O antígeno por nós usado foi-nos gentilmente enviado por SMITH, da Stanford Medical School de S. Francisco. As reações às injeções intra-dérmicas do antígeno em diluições a 1/1000 e 1/100 foram observadas até 72 horas, sendo cuidadosamente medidas com um paquímetro, com precisão de um décimo de milímetro para assim evitar qualquer coeficiente pessoal. De acordo com as instruções de SMITH

as reações menores de meio centímetro de diâmetro foram consideradas negativas.

Os resultados dos testes em 28 pacientes, cujos diagnósticos estavam seguramente firmados, sendo 3 de Belo Horizonte e 25 de São Paulo, do serviço clínico do Dr. Domingos Ribeiro, acham-se inscritos no quadro acima.

Em nenhum dos casos, tratava-se de doença em período terminal, ocasião em que o teste soe ser negativo (KESSEL, 4).

Poder-se-ia, por outro lado, argumentar que o antígeno, sujeito a um transporte a longa distância e a variações climáticas, poderia ter perdido sua atividade. Essa hipótese, porém, afastou-se, pois tivemos o cuidado de devolver a SMITH parte do antígeno empregado, solicitando verificasse novamente sua atividade, a qual foi comprovada pelo citado pesquisador, conforme comunicação pessoal.

Agradecemos ao Prof. CH. E. SMITH ter-nos fornecido o antígeno usado assim como renovado a verificação de sua atividade. Ao Dr. DOMINGOS RIBEIRO, a possibilidade de aproveitamento de casos sob seus cuidados e aos Drs. J. LOPES FARIA e EDGARD A. CERQUEIRA, a valiosa colaboração na execução dos testes.

CONCLUSÕES

Frente aos resultados por nós obtidos, podemos, portanto, concluir que na blastomicose sul-americana ou doença de Lutz o teste cutâneo com *Coccidioidin* dá resultados uniformemente negativos.

Esta verificação vem corroborar a opinião daqueles que consideram distintas as doenças de Posadas-Wernicke e de Lutz.

SUMMARY

The Author carried out cutaneous tests with Coccidioidin (supplied by SMITH of the Stanford Medical School, S. Francisco, Cal) in 28 cases of South-American Blastomycosis (cross-reaction). In 27 of these cases the reaction was definitely negative while in one case only slight erythema prevailed for 72 hours on the positive borderline. These results show that the action of Coccidioidin is specific and also that there are appreciable immuno-allergic differences between coccidioidomycosis and south-american blastomycosis.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, F & LACAZ, C. S., 1941, Intradermo-reação com Paracoccidioidina no diagnóstico do granuloma paracoccidióidico. *Folia Clin. Biol.*, 13: 177 (apud Lacaz, C. S. 1945, *Contribuição para o estudo dos actinomicetos produtores de micetomas*, Tese, Tip. Rossolillo, S. Paulo, pp. 194 e 204).

2. FARNES, C. J. 1941 Coccidioidomycosis, *J. Amer. Med. Ass.*, 116: 1749-1752.
3. FONSECA, O. & ARÊA LEÃO, A. E., 1927, Reaction cutanée spécifique avec le filtrat de cultures de *C. immitis*. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 97 (2): 1796-1797.
4. KESSEL, J. F., 1939, The Coccidioidin Skin Test, *Amer. J. Trop. Med.*, 19: 199-204.
5. SMITH, C. E., 1943, Coccidioidomycosis, *Medical Clinics North America*, May, New York Number, 790-807.
6. VERSIANI, O., 1945, Blastomicose. *Rev. Brasil. Biol.*, 5 (1): 37-60.

INFESTAÇÃO DE APAIARÍS “ASTRONOTUS OCELLATUS” (AGASSIZ) PELO NEMATÓDEO “GOEZIA SPINULOSA” (DIESING, 1839) ¹

J. F. TEIXEIRA DE FREITAS e HERMAN LENT
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 16 figuras no texto)

Por intermédio do Dr. WALDEMAR C. DE FRANÇA, chefe da Comissão Técnica de Piscicultura, recebemos uma série de amostras de helmintos capturados no Posto de Piscicultura de Lima Campos (Estado do Ceará) pelo Dr. OSMAR FONTENELE nos tanques-viveiros mantidos naquele Posto para criação de “apaiarís”, *Astronotus ocellatus* (Agassiz) e de “pirarucús” *Arapaima gigas* (Cuvier).

As amostras de nos. 162, 165 e 173 continham nematódeos adultos, de ambos os sexos, colecionados na cavidade geral e no aparelho digestivo de alevinos de *Astronotus ocellatus* (Agassiz), que determinamos como *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839), até agora referida somente como parasita do estômago de *Arapaima gigas* (Cuvier) na Amazônia.

A amostra no. 167 continha as seguintes indicações: “pequenos vermes isolados de uma amostra de plancton obtida nos tanques-viveiro de *Arapaima gigas* (Cuvier) (“Pirarucú”), em 18-5-945. A coleta foi efetuada com rede de plancton. Os vermes foram encontrados em mistura com microcrustáceos” A amostra no. 169 continha “vermes retirados do aparelho digestivo de uma larva de pirarucú, de 45mm., doente”. A amostra no. 170 continha “vermes colhidos de um pirarucú de 55mm. de comprimento total”.

Estas três amostras só continham larvas do 2.^o estágio com o aspecto que descrevemos adiante, larvas que parecem constituir o estágio infestante de *Goezia spinulosa* (Dies., 1839).

¹ Recebido para publicação a 5 de fevereiro de 1946.

As amostras 168 e 174 continham vários exemplares de *Diaptomus* sp. parasitados por larvas semelhantes às que referimos, microcrustáceos que foram coletados com rêde de plancton nos tanques-viveiro de pirarucú. A infestação dos copépodos é grande e cada exemplar contém uma ou duas larvas.

A mortandade dos alevinos de apaiari, *Astronotus ocellatus* (Agassiz), foi atribuída ao helminto neles constantemente encontrado, crescendo a circunstância de que eram alimentados, na fase planctófaga, com plancton coletado nos tanques-viveiro de pirarucú, *Arapaima gigas* (Cuvier), onde existiam as larvas do 2.^o estágio referidas, possivelmente de *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839).

Si bem que não seja possível afirmar com segurança a identidade das larvas à espécie do helminto, embora elas possuam os cecos esofágiano e intestinal, a hipótese se robustece pelo fato de que quando se deixou de coletar o plancton nesses viveiros, para alimentar os apaiaris, desapareceu a mortandade destes últimos.

Não nos foi possível obter helmintos adultos colecionados em *Arapaima gigas*, pois a criação deste peixe não tem sido possível no Posto de Lima Campos:

“Dos exemplares adultos de pirarucú, mantidos nos tanques-viveiro, somente foram observadas seis desovas, no intervalo de 30-12-44 a 26-5-45, das quais somente conseguimos criar, até o comprimento total de 70mm., vinte exemplares; todos os outros alevinos ou larvas eram encontrados mortos à superfície da água dos tanques. Em inúmeras necrópsias que efetuei, sempre constatei a existência de inúmeros helmintos. Os pequenos alevinos eram sempre criados em companhia dos reprodutores até o comprimento total de 40mm., quando então, os poucos que logravam atingir este tamanho, eram transferidos para os tanques de alevinagem. Mas, mesmo após isto, continuavam a morrer”. (Informação epistolar do Dr. Osmar Fontenele).

É provável que os pirarucús sejam infestados intensamente pela *Goezia spinulosa* (Dies., 1839), que foi transportada, com o plancton, para os tanques de criação dos apaiaris, onde encontrou hospedador que permitiu também seu desenvolvimento.

Realmente, o fato certo que temos em mão é o parasitismo de *Astronotus ocellatus* (Agassiz) por *Goezia spinulosa* (Diesing), até agora referido somente de *Arapaima gigas* (Cuvier). Tratando-se de

espécie poucas vezes assinalada, descrita há mais de um século e somente reestudada não completamente, por BAYLIS, em 1927, damos uma descrição pormenorizada e muitos desenhos elucidativos.

O histórico da espécie pode ser visto, com abundância de detalhes, no trabalho de DOLLFUS (1935).

Goezia spinulosa (Diesig, 1839)

Comprimento — Machos 6,36 a 15,24 mm.; fêmeas 11,72 a 16,18 mm.

Largura — Machos 0,37 a 0,77 mm.; fêmeas 0,80 a 0,87 mm.

Corpo forte, com cutícula recoberta de fileiras de espinhos, que se iniciam a 0,029 mm. da base dos lábios nos machos e a 0,021 mm. nas fêmeas, estendendo-se até a extremidade posterior do corpo. A distância entre as fileiras varia de 0,008 a 0,042 mm. nos machos e 0,008 a 0,034 mm. nas fêmeas; a menor distância é encontrada entre as 1a. e 2a. fileiras e entre aquelas situadas na metade posterior do corpo; a maior distância se observa, aproximadamente, ao nível do fim do esôfago, onde os espinhos apresentam maiores dimensões. Os machos possuem cerca de 860 fileiras de espinhos e as fêmeas cerca de 1150.

DISTANCIA, EM MM., ENTRE AS FILEIRAS DE ESPINHOS *

FILEIRAS			MACHOS	FEMEAS	FILEIRAS			MACHOS	FEMEAS
Da	1. ^a	para a	2. ^a	0,008	Da	38. ^a	para a	39. ^a	0,029
Da	2. ^a	para a	3. ^a	0,013	Da	40. ^a	para a	41. ^a	0,021
Da	5. ^a	para a	6. ^a	0,017	Da	41. ^a	para a	42. ^a	0,034
Da	8. ^a	para a	9. ^a	—	Da	45. ^a	para a	46. ^a	0,029
Da	11. ^a	para a	12. ^a	0,021	Da	47. ^a	para a	48. ^a	0,025
Da	13. ^a	para a	14. ^a	—	Da	53. ^a	para a	54. ^a	0,021
Da	15. ^a	para a	16. ^a	0,025	Da	63. ^a	para a	64. ^a	0,038
Da	16. ^a	para a	17. ^a	—	Da	72. ^a	para a	73. ^a	0,034
Da	19. ^a	para a	20. ^a	—	Da	83. ^a	para a	84. ^a	0,017
Da	20. ^a	para a	21. ^a	0,029	Da	106. ^a	para a	107. ^a	0,013
Da	23. ^a	para a	24. ^a	0,034	Da	117. ^a	para a	118. ^a	0,021
Da	26. ^a	para a	27. ^a	0,038	Da	120. ^a	para a	121. ^a	0,008
Da	28. ^a	para a	29. ^a	0,042	Da	316. ^a	para a	317. ^a	0,017
Da	33. ^a	para a	34. ^a	0,034	Da	365. ^a	para a	366. ^a	0,013
Da	37. ^a	para a	38. ^a	0,029	Da	400. ^a	para a	401. ^a	0,008

* As fileiras que não são mencionadas possuem distância idêntica à imediatamente superior. Depois da 400a. fileira não aumenta a distância assinalada.

Extremidade anterior fracamente atenuada, com 3 lábios típicos. Extremidade posterior atenuada em ambos os sexos. Boca trilabiada. Lábios separados do resto do corpo por uma constricção, cada um possuindo a cutícula

expandida externamente, de modo a haver superposição nas extremidades de cada qual. Os lábios medem cerca de 0,050 a 0,071 mm. de comprimento por



Fig. 1 — *Diaptomus* sp., com larva do 2.º estágio. Fig. 2 — *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839), macho, desenho total (a escala corresponde a 0,5 mm.). Original.

0,109 a 0,155 mm. de largura nos machos e 0,061 mm. por 0,122 mm. nas fêmeas; em sua porção mediana formam dois lobos salientes, em cuja super-



Goezia spinulosa (Diesing, 1839) — Fig. 3: Fêmea jovem (a escala corresponde a 0,5 mm.); fig. 4: fêmea grávida (a escala corresponde a 1 mm.); fig. 5: larva do 2.º estágio (a escala corresponde a 0,1 mm.). Figuras originais.

fície interna existe uma pequena serrilha quitinosa. O lábio dorsal possui 2 papilas duplas; cada um dos lábios látero-ventrais possui uma papila dupla ventral e uma papila simples dorsal, além de uma diminuta formação também dorsal que parece representar a abertura de uma glândula cefálica. Esôfago claviforme, com 0,67 a 1,0 mm. de comprimento por 0,11 a 0,14 mm. de maior largura nos machos e 1,0 a 1,1 mm. por 0,25 mm. nas fêmeas; sua terminação fica, aproximadamente, ao nível do espaço que separa a 34a. da 35a. fileira de espinhos nos machos e a 37a. da 38a. nas fêmeas. Ventrículo presente, pequeno, com 0,087 a 0,104 mm. de comprimento por 0,148 a 0,174 mm. de largura nos machos e 0,087 mm. por 0,139 a 0,148 mm. nas fêmeas. Ceco esofagiano presente, entortilhado ou não, com 2,16 a 2,29 mm. de comprimento por 0,083 a 0,1 mm. de largura média nos machos e 2,51 a 2,90 mm. por 0,083 a 0,1 mm. nas fêmeas. Ceco intestinal presente, com 0,4 a 0,6 mm. de comprimento por 0,15 a 0,33 mm. de largura média nos machos e 0,50 a 0,66 mm. por 0,28 a 0,35 mm. nas fêmeas. Intestino longo, de paredes espessas e mais

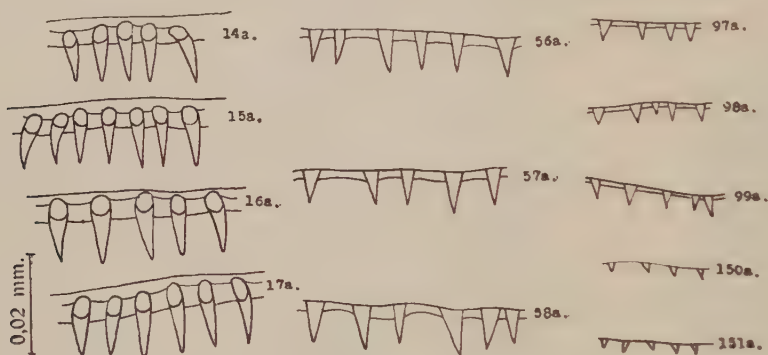
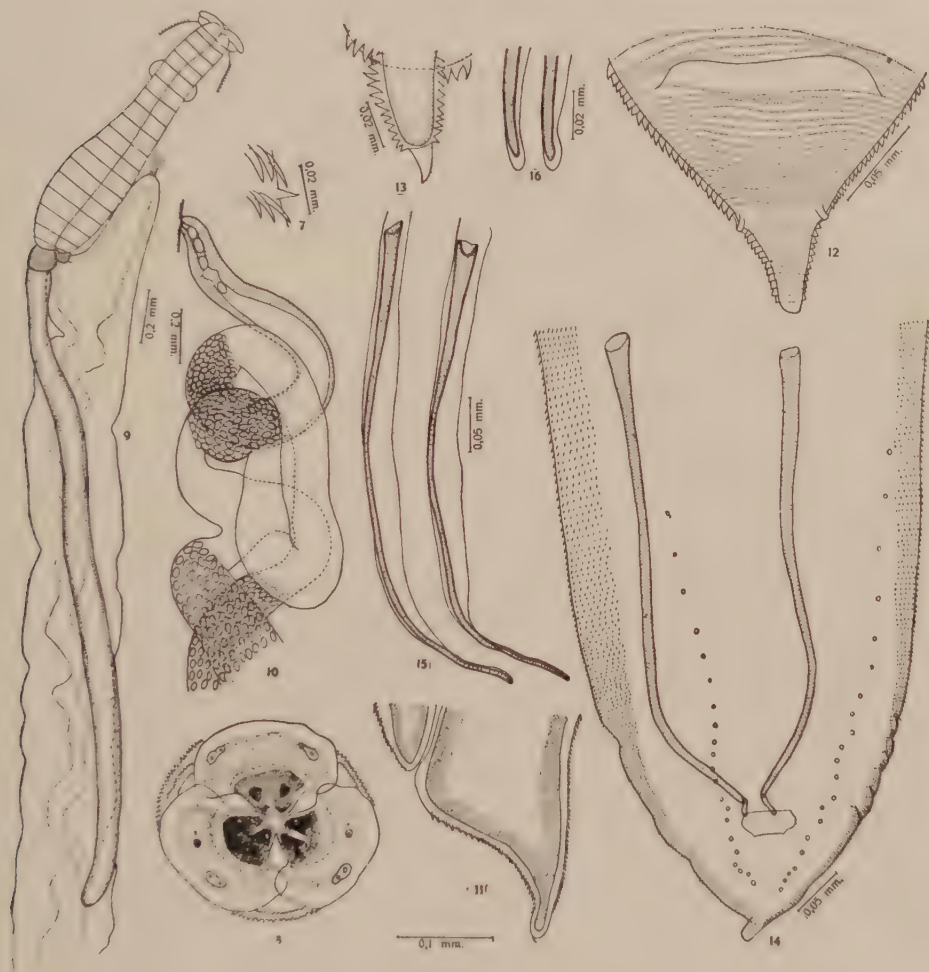


Fig. 6 — *Goesia spinulosa* (Diesing, 1839), fileiras de espinhos cuticulares do macho. Original

ou menos pregueadas. Anel nervoso situado a 0,25 a 0,28 mm. da extremidade anterior nos machos e a 0,31 a 0,38 mm. nas fêmeas. Papilas cervicais pequenas e cônicas, situadas a 0,28 mm. da extremidade anterior nos machos, localizadas entre as 20a. e 21a. fileiras de espinhos. Poro excretor não evidenciado.

Fêmeas — Ovíparas, didelfas, opistodelfas, com vulva pequena, não saliente, situada entre as 332a. e 333a. fileiras de espinhos, distando 5,19 a 6,23 mm. da extremidade anterior. Ovejector com paredes relativamente delgadas, dirigido para trás, com 3,0 a 3,6 mm. de comprimento, sendo 0,66 mm. para a porção vaginal, que é mais delgada que o vestibulo. Úteros relativamente pequenos, com a porção mais próxima aos oviductos funcionando como espermateca. Oviductos delgados, relativamente curtos. Ovários muito longos. Ovos de casca lisa e delgada, deformáveis, blastomerizados, com 0,050 mm. de comprimento por 0,038 mm. de largura. Todo o aparelho genital se apresenta mais ou menos entortilhado, ficando o tubo intestinal situado entre os dois ramos genitais. Ovários terminando ao nível do início do reto. Reto com 0,25 a 0,28 mm. de comprimento. Extremidade posterior atenuada, com

1 par de papilas laterais pequenas situadas a 0,063 a 0,076 mm. do ápice, que é arredondado e possui um pequeno apêndice terminal, cônico, de 0,017 mm. de comprimento, facilmente destacável. Abertura anal grande, situada a 0,22 a 0,23 mm. do ápice caudal; entre ela e a terminação do corpo existem 38 fileiras de espinhos.



Goetzia spinulosa (Diesing, 1839) — Fig. 7: Papila cervical do macho; fig. 8: boca, de frente; fig. 9: início do aparelho digestivo do macho; fig. 10: ovejector; fig. 11: cauda da fêmea, vista lateral; fig. 12: cauda da fêmea, jovem, vista ventral; fig. 13: terminação caudal da fêmea; fig. 14: cauda do macho, vista ventral; fig. 15: espículos; fig. 16: extremidade distal dos espículos. (As figs. 8 e 11 são reproduzidas de BAYLIS e as demais são originais).

Machos — Com espículos iguais, com 0,41 a 0,52 mm. de comprimento, base levemente dilatada e ponta atenuada, de ápice arredondado; distalmente possuem uma asa membranosa. Gubernáculo ausente. Extremidade posterior atenuada, com abertura anal grande, situada a 0,09 a 0,13 mm. do ápice caudal. Papilas caudais sesseis, pequenas, em número de 21 pares, dos quais

6 post-anais, 2 adanais e os demais pre-anais. Cauda terminada por um pequeno apêndice cilíndrico, que mede 0,017 a 0,021 mm. de comprimento. Cloaca relativamente curta, de paredes espessas e fortes. Canal ejaculador e canal deferente de paredes fortes. Testículo enovelado na região média do corpo, não atingindo o nível do fim do esôfago.

Fêmea jovem — Comprimento 8,71 mm.; largura 0,50 mm.; número de fileiras de espinhos 1140; número de fileiras post-anais 32. Lábios com 0,052 mm. por 0,157 mm.; esôfago com 0,78 mm. por 0,20 mm.; ventrículo com 0,087 mm. por 0,104 mm.; ceco esofagiano com 2,57 mm. por 0,09 mm.; ceco intestinal com 0,39 mm. por 0,17 mm. Fim do esôfago entre as 45a. e 46a. fileiras de espinhos. Anel nervoso a 0,28 mm. da extremidade anterior. Vulva a 3,52 mm. da extremidade anterior, entre as 356a. e 357a. fileiras de espinhos; ovejector com 1,58 mm. Anus a 0,15 mm. da extremidade posterior. Papilas caudais a 0,059 mm. do ápice caudal.

Habitat — Alevinos de *Astronotus ocellatus* (Agassiz) em criação em tanques-viveiro.

Proveniência — Posto de Piscicultura, Lima Campos, Estado do Ceará, Brasil.

Larva do 2º estágio — Comprimento 1,81 a 2,41 mm.; largura 0,074 a 0,096 mm.

Corpo com cutícula desprovida de espinhos, porem com estriação transversal muito forte. Extremidades atenuadas. Extremidade anterior com um espinho cefálico que mede 0,004 mm. de comprimento. Boca com lábios não definitivamente diferenciados. Esôfago levemente claviforme, com 0,18 a 0,25 mm. de comprimento por 0,021 a 0,025 mm. de largura. Ventrículo apenas esboçado. Ceco esofagiano presente, com 0,73 a 0,83 mm. de comprimento por 0,017 a 0,025 mm. de largura média. Ceco intestinal pequeno, com 0,021 mm. de comprimento. Intestino longo, retilíneo. Reto com 0,046 a 0,055 mm. de comprimento. Anus situado a 0,046 a 0,063 mm. do ápice caudal, que é arredondado. Aparelho genital não esboçado. Anel nervoso situado a 0,113 mm. da extremidade anterior. Duas glândulas cefálicas presentes, atingindo o nível do fim do esôfago.

BIBLIOGRAFIA

- BAYLIS, H. A., 1927, Some parasitic worms from *Arapaima gigas* (Teleostean fish) with a description of *Philometra senticosa* n. sp. (Filarioidea). *Parasitology*, 19 (1): 35-47, figs. 1-12
- DOLLFUS, R. P., 1935, Nématode du genre *Goezia* chez une truite arc-en-ciel (*Salmo irideus* W. Gibbons) d'élevage. *Bull. Soc. Zool. France*, 60: 244-265, figs. 1-11.

PLASMA TRYPTASE UNDER VARYING EXPERIMENTAL CONDITIONS¹

M. ROCHA E SILVA and SYLVIA O. ANDRADE

Instituto Biológico, São Paulo, Brasil

Considerable interest is being attached to the study of activation of proteolytic enzymes in several morbid conditions. The liberation of a trypsinlike enzyme from burnt skin was recently shown by BELLOFF & PETERS (1) and from the damaged perfused liver by RAWLINSON & KELLAWAY (2). The liberation of peptidases from the burnt legs of dogs, calves and rats was verified by ZAMECNIK et al. (3). Increase in tryptic activity of the blood was mentioned by TAGNON (4) to occur in traumatic and hemorrhage shocks; a similarity between kidney damage produced by trypsin and that observed in crush-injury syndrome was stressed by MIRSKY et al. (5); reports by CHRISTENSEN & MAC LEOD (6) and CHRISTENSEN (7) definitely proved that staphylococcal fibrinolysin works through activation of plasma protease. Those facts give emphasis to a more detailed study of plasma trypsin and the conditions which are conducive to its activation.

Although the presence of a trypsin-like enzyme in the blood was definitely shown by SCHMITZ (8) in 1937, only very few data are available on the behavior of this enzyme under experimental conditions. IYENGAR et al. (9) have studied the variations of plasma trypsin in certain clinical circumstances and have verified the remarkable fact that platelets contain a kinase which splits the complex trypsin + inhibitor, this constituting the main source for active trypsin in the blood. Considering the obvious implications of this fact to the mechanism of blood clotting as viewed by FERGUSON (10) it became extre-

¹ Received for publication February 1, 1946.

Department of Biochemistry and Pharmacodynamics.

mely important to verify and extend further the findings of IYENGAR et al. Moreover, we have recently shown (11) that the rupture of platelets in the liver capillaries of the dog constitutes an indispensable event leading to the discharge of histamine during anaphylactic shock. That this discharge is mediated through activation of plasma trypsin appeared to constitute a very attractive possibility, since tissue injury by trypsin is very similar to that produced by anaphylaxis (12, 13, 14) and also by the above mentioned fact that plasma trypsin is activated by a kinase derived from platelets.

EXPERIMENTAL

We have submitted the technique described by SCHMITZ (8) to a careful analytical test, in order to verify which conditions were more adapted to our purpose. After many trials which are described in detail in the text, we have adopted the following procedure:

Estimation of free trypsin — Oxalated blood (1/10 of a M/10 solution of sodium oxalate) was collected in paraffined vials and centrifuged for 15 minutes at 3,500 r.p.m. in an angle centrifuge. Two ml of the perfectly clear plasma were transferred to a 50 ml centrifuge tube and treated with 20 ml of acetone. After short standing, the precipitate was collected by centrifugation and washed with 10 ml of acetone. After centrifugation and pouring off the supernatant, the precipitate was quickly dried in a vacuum dessicator. The dry powder was resuspended (partially redissolved) in 10 ml of a phosphate buffer mixture (pH 8.4). After incubation for 48 hours at 38°-39°, the material was precipitated with an equal volume of 10% trichloroacetic acid solution and the NPN estimated in the filtrate.

Estimation of total trypsin — Two ml of the clear plasma was transferred to a 50 ml centrifuge tube and treated with 18 ml of a 2.5% trichloroacetic acid solution. The precipitate collected by centrifugation was washed with a new 10 ml portion of trichloroacetic acid solution and the precipitate collected again by centrifugation is redissolved in 3 ml of saline; 40 ml of acetone are poured in and the precipitate collected, washed again with 20 ml of fresh acetone and dried *in vacuo*. The residue is resuspended in 10 ml of phosphate buffer solution and incubated for 48 hours at 38°-39° and the NPN estimated as described for free trypsin.

The experiments with heparin were partly done with a fairly active preparation (Th. Schuchardt, Germany) and partly with a potent Connaught preparation (110 units per mg.) kindly supplied by Dr. L. B. Jacques from Toronto, Canada.

All the estimations of NPN were done following the micro-Kjeldahl procedure as modified by Pregl. Differences of 0.03 mg of nitrogen were found reliable. Details concerning the different experimental procedures are indicated in the text.

RESULTS

Presence of free and bound trypsin in normal plasma — The presence of free and bound trypsin was verified in the plasmas of all animals so far assayed and in human plasmas. Table I, shows the estimations of free and total trypsin in the plasmas of human, dogs, rabbits, pigeons, horses and guinea pig.

TABLE I

Estimation of free and total trypsin in plasmas of different animal species

NUMBER OF DETERM.	ANIMAL	TRYPSIN (mg NPN/100 ml plasma)	
		Total	Free
1.....	man	73.3	27.0
1.....	guinea pig	73.2	28.8
3.....	rabbit	62.1 ± 8.7	10.1 ± 0.1
4.....	dog	118.8 ± 13.4	28.7 ± 7.8
2.....	pigeon	46.7 ± 3.4	6.8 ± 2.0
3.....	horse	34.6 ± 1.0	7.9 ± 5.1
1.....	rat	127.0	40.1

Note: The figures represent the averages + average deviation for all determinations in each animal species.

Effect of the concentration of the trichloroacetic acid solution for precipitation of total trypsin — As first pointed out by SCHMITZ (8) trichloroacetic acid is able to split the complex trypsin + inhibitor, this constituting the basis for the method of estimating total trypsin. Furthermore, the washing of the precipitate with acetone was found necessary to remove still further traces of the inhibitor held by the precipitate. We have verified that if the precipitate is redissolved in a small amount of saline (3 ml), before the addition of the acetone, a definite increase in NPN after incubation can be detected (Table II).

TABLE II

Effect of the amount of trichloroacetic acid used for estimation of total trypsin

EXP. N.º	MATERIAL USED	CONCENTRATION OF TRICHLOROACETIC ACID	TOTAL TRYPSIN (mg NPN/100 ml plasma)
I.....	dog plasma	2.5 %	28.2
II.....	same	2.5 %	36.0
III.....	same	5.0 %	63.6

Note: The precipitate of I was treated with 40 ml of acetone; the precipitates of II and III were resuspended in 3 ml of saline and reprecipitated with 40 ml of acetone. Time of incubation: 24 hours.

Although the total trypsin recovered after precipitation with a more concentrated solution of trichloroacetic acid was considerably increased, we have found a 2.5% concentration more suitable for a standardized procedure. This, however, indicates that the data described as total trypsin are actually aliquots of the total trypsin present in plasma.

Time of incubation — As SCHMITZ (8) and IYENGAR et al. (9) did before, we have established as the standard procedure to incubate the samples for 48 hours, although the enzymatic reaction proceeds further if more time is allowed for the splitting of the substrate. Experiments referred to in Table III were done upon total trypsin and samples were taken after 16, 24, 30, 48 and 72 hours of incubation.

TABLE III

Influence of the time of incubation upon the amount of NPN estimated in samples for total trypsin.

EXP. N.º	MATERIAL USED	TIME OF HYDROLYSIS (HOURS)	TOTAL TRYPSIN (mg NPN/100 ml)
I.....	dog plasma	16	52.0
	same	24	87.0
	same	48	111.0
II.....	horse plasma	16	15.1
	same	24	21.4
	same	29	31.0
	same	48	34.0
	same	72	47.0

Influence of the pH — In another set of experiments, the final dry residue for total trypsin was resuspended in buffer solution of varying pH and incubated for 48 hours. For the range of pH comprised between 6.5 and 10.5 a mixture of phosphates was used, while for pH values below 6, citrate buffers were used. The optimum of pH for the trypsin-like enzyme in plasma was closely comprised between pH 7.5 and 8.5. Below 7 or above 8.5 the amount of NPN estimated after incubation rapidly sinks to very low levels. At pH 4, 5 or 10 only traces of NPN were estimated in the filtrates.

Influence of the coagulation of the blood — As postulated by FERGUSON (10) trypsin might constitute an important factor in the physiological process of blood coagulation. Therefore, the study of the variations of free and total trypsin in the blood during the clotting process deserves special attention. We have estimated trypsin in the plasma and serum, after coagulation by addition of suitable amounts of calcium chloride solution. Although in certain experiments (Table IV) there was a definite indication of an activation of trypsin in the process (experiments III and IV), in most of the cases total trypsin was drastically reduced, this being probably related to the adsorption of the enzyme by the formed fibrin. This finding is in agreement with that shown by SCHMITZ (8). The fact that the ratio free/total trypsin always increased during the process seems to indicate that the adsorbed trypsin corresponds to the activated form of the enzyme.

TABLE IV

Estimations of free and total trypsin in plasma and serum, before and after coagulation of the blood

EXP. N.º	MATERIAL USED	TRYPSIN (mg NPN/100 ml plasma)		RATIO FREE TOTAL
		Total	Free	
I.....	human plasma	73.3	27.0	0.33
	serum	33.1	15.9	0.48
II.....	rabbit plasma	55.4	10.0	0.18
	serum	26.9	7.2	0.28
III.....	dog plasma	85.8	13.1	0.15
	serum	88.1	61.9	0.70
IV.....	dog plasma	96.6	27.1	0.28
	serum	50.0	47.0	0.86
V.....	dog plasma	100.0	5.4	0.05
	serum	40.0	5.0	0.12

Presence of a kinase for trypsin in extracts of platelets — As shown by IYENGAR et al. (9) platelets contain a kinase which is able to split the combination of the trypsin with the inhibitor. This activation of trypsin is definitely shown in 3 out of 4 experiments presented in Table V.

TABLE V
Activation of plasma trypsin through platelets extracts.

EXP. N.º	MATERIAL USED	TRYPSIN (mg NPN/100 ml)	
		Total	Free
I.....	Dog plasma	185.4	34.6
	same + platelet extr.	—	53.2
II.....	Dog plasma	116.0	35.0
	same + platelet extr.	—	35.2
III.....	Dog plasma	96.6	27.1
	same + platelet extr.	105.6	81.7
IV.....	Dog plasma	86.2	35.6
	same + platelet extr.	100.7	96.4

Note: 0.2 ml of a macerate of platelets in distilled water (corresponding to 1 ml of blood) were added to 2 ml of plasma and free and total trypsin estimated.

Activation of plasma trypsin was also obtained through the interaction of a very active anti-platelet serum, injected intravenously. Since those experiments are still in progress, they will be referred to in a future paper.

Influence of heparin upon plasma trypsin — In a few instances, heparin has been found to counteract the effects of trypsin upon casein (15, 16), although a more recent report (17) claims that heparin has no inhibitory effect upon the splitting of hemoglobin by commercial trypsin. More recently, HORWITT (18) explained the failure of heparin to counteract the effect of commercial trypsin by demonstrating that chymotrypsin is a major constituent of commercial trypsin and that heparin has no inhibitory effect upon chymotrypsin. As heparin is being largely used as a therapeutic agent against thrombosis and recently (19) there was a report showing the protective action of heparin against necrosis produced by frost bite, we have found advisable to study the effect of heparin upon plasma trypsin.

As shown in Table VI, heparin had a strong inhibitory effect upon total and free trypsin. When added *before* the precipitation with trichloroacetic acid the inhibitory effect of heparin was stronger than when added *after* the preparation was set up for incubation. This suggests that the anti-proteolytic effect of heparin needs a plasma component which is partially removed by precipitation with trichloroacetic acid.

TABLE VI
Influence of heparin upon total and free trypsin

EXP. N.º	MATERIAL USED	AMOUNT OF HEPARIN ADDED	TRYPSIN (mg NPN/100 ml plasma)	
			Total	Free
I.....	Dog plasma	none	95.2	20.0
	same + heparin	2 mg	73.3	8.6
	same + heparin	2 mg	74.0	9.5
II.....	Dog plasma	none	116.2	35.2
	same + heparin	2 mg	—	0
III.....	Dog plasma	none	111.0	11.9
	same + heparin	1.5 mg	106.4	—
IV.....	Dog plasma	none	129.0	16.2
	same + heparin	2 mg	75.8	0
	same + heparin	5 mg	39.8	0
V.....	Dog plasma	none	91.4	31.9
	same + heparin	2 mg	85.6	3.5
	same + heparin	5 mg	34.8	—1.0
VI.....	Dog plasma	none	114.0	19.4
	same + heparin	10 mg	12.6	4.8
	same + heparin*	5 mg	77.4	—
	same + heparin*	10 mg	49.9	—
VII.....	Dog plasma	none	117.2	17.2
	same + heparin	10 mg	69.9	7.4
	same + heparin*	5 mg	109.2	—
	same + heparin*	10 mg	68.8	—

Note: The specified amount of heparin was added to the plasmas and after short standing at room temperature, the material was submitted to the procedures for estimation of free and total trypsin. Experiments I to III were made with the Schuchardt heparin, while experiments IV to VII were performed with the Connaught crystalline sodium salt of beef heparin (110 units per mg). In experiments marked with *, the specified amount of heparin was added when the preparation was set up for incubation, after precipitation with trichloroacetic acid.

Influence of chloroform, ether and alcohol upon free trypsin — As shown by TAGNON (20) chloroform when added to blood brings forth a coagulation of it followed by rapid redissolution of the formed

fibrin. This was suggested to depend upon an activation of plasma trypsin which would be responsible for the fibrinolytic effect described. The experiments presented in Table VII bring direct proof for this contention, since chloroform is able to activate free trypsin. The material used in those experiments was a dry powder obtained from 25 ml of dogs plasma, by treatment with 250 ml of acetone. Four samples of this powder (250 mg.) were submitted to the following treatments: I) the first sample received 0.5 ml of saline + 10 ml phosphate buffer; II) the second sample was treated with 0.5 ml of chloroform, thoroughly mixed with it and then 10 ml of the phosphate buffer were added; III) the third sample was resuspended in 10 ml of the phosphate buffer and then 0.5 ml of chloroform was added with strong stirring; IV) the fourth sample was suspended in 3 ml of saline and reprecipitated with 10 volumes of a 2.5% solution of trichloroacetic acid for estimation of total trypsin.

TABLE VII

Activation of plasma trypsin by chloroform

EXP. N.º	CONDITIONS OF THE EXPERIMENTS	mg NPN/100 g powder after 48 hours incubation
I.....	250 mg "free trypsin" powder + 10.5 ml phosphate buffer.....	85.0
II.....	Same + chloroform (0.5 ml) and after: 10 ml of buffer.....	245.0
III.....	Same + 10 ml buffer and after 0.5 ml chloroform.....	155.0
IV.....	Total trypsin after treatment with 2.5% trichlor. acid.....	328.0

As shown in table VII, the addition of 0.5 ml of chloroform to the dry powder produced considerable activation of the free trypsin, while the addition of the same amount of chloroform to the suspension of the powder in phosphate buffer had a lesser effect. Similar experiments performed with ether and alcohol gave negative results, even when 10 to 20 ml of the solvents were added to the dry powder.

DISCUSSION

Trypsin is found in normal plasma in a free and a bound phase. In this last condition trypsin is supposed to be combined with a trypsin inhibitor which was obtained in a purified condition by SCHMITZ (21). Precipitation with acetone brings down the whole complex and an appreciable amount of inert proteins which will constitute the substrate for the enzyme. Trichloroacetic acid in concentrations up to 2.5% liberates free trypsin from the inert complex, probably by partially or totally dissolving the inhibitor. Chloroform was found to do the same in a lesser scale, although alcohol or ether were found unable to dissociate the complex or otherwise solubilize the inhibitor of trypsin. By its pH optimum, relative stability and the capacity of combining with an inhibitor, this proteolytic enzyme present in blood plasma is very similar to pancreas trypsin, although direct proof that it displays the same specificity (toward benzoyl-L-arginineamide) (22) is still lacking. CHRISTENSEN & MAC LEOD (6) have recently suggested that the tryptase found in plasma is present in an inactive form analogous to pancreas trypsinogen. Against this contention one might recall that dilute trichloroacetic acid removes the plasma inhibitor for trypsin, while it has no activating effect upon pancreas trypsinogen (see NORTHROP, 23). Our results and those previously reported by several investigators are certainly better understood by accepting the view that plasma trypsin forms a complex with the inhibitor.

As shown by IYENGAR et al. (9) and confirmed in this report, platelets contain a kinase which dissociates the complex trypsin + inhibitor, liberating free active trypsin. Heparin, on the contrary partially or totally inhibited free trypsin and this is in accord to the previous findings of HORWITT (15) and GLAZCO & FERGUSON (16) who have described a similar anti-proteolytic effect of heparin toward trypsin. Upon total trypsin also, heparin considerably reduced its activity. This effect is rather intriguing. According to the experimental conditions in which heparin was observed to reduce the activity of total trypsin is important to recall that heparin was added *before* the addition of the trichloroacetic acid and thus, it appeared to strengthen the effect of the natural inhibitor present in plasma. Since heparin appears to work according to the mass law as recently emphasized by JAUQUES (24) it becomes very attractive the possibility advanced by FERGUSON (10) that the trypsin inhibitor present in plasma is con-

cerned in a certain way with heparin itself. In more definite terms, the hypothesis of FERGUSON (10) assumed that heparin might constitute a prosthetic group for the polypeptide-like trypsin inhibitor.

All those facts seem to have a bearing upon the theory advanced by FERGUSON (10) that activation of trypsin might constitute an important preliminary step in the process of blood coagulation. Rupture of platelets as shown directly in the ultra-microscope (25) seems to be the first event preceding the formation of fibrin threads. The liberation of the kinase present in platelets would be an obvious consequence of this platelet desintegration and the liberation of free trypsin, the next step in the process leading immediately to the production of fibrin.

The *trypsin problem* as formulated before (12) is growing rather swiftly. As trypsin displays innumerable physiological and pharmacological properties, the exact knowledge of its distribution in tissues and organic fluids deserves particular attention in many pathological conditions. We can already enumerate a few pathological conditions in which the activation of plasma trypsin might play a role: anaphylactic shock (12, 13, 14), traumatic and hemorrhage shocks (4), shock induced by extensive burns (1, 3), purpura and Schwartzman phenomenon (26). Progress along those lines has been slow in the past owing to the lack of a simple and reliable procedure to study the proteolytic system of plasma. For instance, there are still reports dealing with estimations of trypsin in serum. This, as shown in this paper, constitutes a highly unreliable source for trypsin. The technique of SCHMITZ, as modified by IYENGAR and by us, seems to constitute a starting point to attack the trypsin problem in a reliable and accurate way.

SUMMARY

A method for estimating free and total trypsin in blood plasma is described in detail. Plasma trypsin is estimated in blood collected from humans, guinea pigs, rabbits, dogs, horses and rats. The conditions of precipitation of trypsin by trichloroacetic acid and acetone, the time for incubation, as well as the influence of the pH were studied in detail.

The variations of free and total trypsin during the clotting process were studied in the blood of human, rabbit and dog. An increase in free trypsin was observed in two cases, while drastic reductions of total trypsin were observed in most of the cases, with an increase in the ration free/total trypsin.

Aqueous extracts from blood platelets had a definite activating effect upon plasma trypsin. On the contrary, heparin exerted a strong inhibitory effect upon both free and total trypsin. When added after the precipitation of plasma trypsin with trichloroacetic acid and incubated with the whole system, the inhibitory effect of heparin was lesser, but still strong.

Chloroform had a definite activating effect upon plasma trypsin, while ether and alcohol had no effect. This effect of chloroform is understood as a consequence of its solubilizing effect upon the trypsin inhibitor.

The significance of those facts is discussed in relation to their probable pathological and physiological implications.

RESUMO

A tripsina é encontrada no plasma sanguíneo das diferentes espécies animais estudadas, sob forma livre e sob forma combinada com um inibidor. O precipitado obtido tratando-se o plasma com 10 volumes de acetona, contém o complexo tripsina-inibidor, pequena quantidade de tripsina livre e ainda proteínas inertes que funcionam como substrato para a tripsina livre. O ácido tricloroacético, em concentrações superiores a 2,5%, liberta a tripsina livre, do complexo inerte, provavelmente por um efeito solubilizante sobre o inibidor. O clorofórmio exerce efeito análogo, bastando que se adicione 0,1 cc. de clorofórmio ao plasma total ou ao precipitado acetônico. Depois de agitação, verifica-se considerável aumento do teor em tripsina livre. Tratando-se o mesmo material com éter ou álcool (10 a 20 cc. para 1 cc. de plasma) não se produziu qualquer alteração apreciável do teor de tripsina livre. Extratos de plaquetas contêm uma quinase capaz de ativar a tripsina plasmática. Este fato, verificado primeiro por IYENGAR e cols. (9) e confirmado neste laboratório, indica a possibilidade da ativação da tripsina do plasma desempenhar papel importante em certos estados patológicos em que ocorra destruição maciça de plaquetas (choque anafilático, fenômeno de Schwartzman, púrpura trombocitopênica, etc.). Ao contrário, a heparina, em doses compreendidas entre 2 a 10 miligramas por 1 cc. de plasma, inibe total ou parcialmente a tripsina livre e parcialmente a tripsina ativada pela precipitação pelo ácido tricloroacético (tripsina total). Este último fato sugere que o inibidor natural da tripsina plasmática apresente alguma analogia de composição química com a heparina, hipótese que foi formulada por FERGUSON (16). No trabalho, é apresentada uma discussão desses fatos, em relação com a recente teoria de FERGUSON de que a tripsina plasmática constituiria o *missing link*, na cadeia de reações químicas e enzimáticas que conduzem à coagulação do sangue.

REFERENCES

1. BELOFF, A. & PETERS, R. A., 1945. Observations upon thermal burns: the influence of moderate temperature burns upon a proteinase of skin. *J. Physiol.*, 103: 461-476.
2. RAWLINSON, W. A. & KELLAWAY, C. H., 1944, Studies on tissue injury by heat. II. The liberation of enzymes from the perfused liver. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 22: 69.

3. ZAMECNICK, P. C., STEPHENSON, M. L. & COPE, O., 1945, Peptidase activity of lymph and serum after burns. *J. Biol. Chem.*, 158: 135-144.
4. TAGNON, H. J., 1945, The nature and mechanism of shock produced by the intravenous injection of chymotrypsin. *Amer. J. Physiol.*, 143: 644-655.
5. MIRSKY, I. A. & FREIS, E. D., 1944, Renal and hepatic injury in trypsin "shock". *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57: 278.
6. CHRISTENSEN, L. R. & MAC LEOD, C. M., 1945, A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation and reaction with inhibitors. *J. Gen. Physiol.*, 28: 559-583.
7. CHRISTENSEN, L. R., 1945, Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. *J. Gen. Physiol.*, 28: 363-383.
8. SCHMITZ, A., 1937, Ueber die Freilegung von aktivem Trypsin aus Blutplasma. *Z. Physiol. Chem.*, 250: 37-46.
9. IYENGAR, N. K., SEHRA, K. B. & MUKERJI, B., 1942, Proteolytic system in normal and various pathological conditions. *Ind. Med. Gaz.*, 57: 348.
10. FERGUSON, J. H., 1943, A new blood-clotting theory. *Science*, 97: 319-322.
11. ROCHA e SILVA, M., FORTO, A. & ANDRADE, S. O., 1945, *Arch. Surg.*, In the press.
12. ROCHA e SILVA, M., 1940, Beitrag zur Pharmakologie des Trypsins. I und II. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 194: 335-361.
13. FELDBERG, W., 1941, Histamine and anaphylaxis. *Ann. Rev. Physiol.*, 3: 671-694.
14. DRAGSTEDT, C. A. & WELLS, J. A., 1944, The pharmacological action of trypsin. *Q. Bull. N. U. Med. School*, 18: 104-103.
15. HORWITT, M. K., 1940, The anti-tryptic properties of heparin. *Science*, 92: 89-91.
16. GLAZCO, A. J. & FERGUSON, J. H., 1940, Inhibition of tryptases by heparin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 45: 43-46.
17. WELLS, J. A., DRAGSTEDT, C. A., COOPER, J. A. & MORRIS, H. C., 1945, Observation of the antagonism between heparin and trypsin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 58: 57.
18. HORWITT, M. K., 1945, Trypsin and chymotrypsin versus heparin. *Science*, 101: 376-377.
19. LANGE, K., BOYD, L. J. & LOEWE, L., 1945, The functional pathology of frost bite and the prevention of gangrene in experimental animals and humans. *Science*, 102: 151-152.
20. TAGNON, H. J., 1942, The significance of fibrinolysis in mechanism of coagulation of blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 27: 1119-1131.
21. SCHMITZ, A., 1938, Ueber den Trypsin-Inhibitor des Blutes. *Z. physiol. Chem.*, 255: 234-249.
22. BERGMANN, M. & FRUTON, J. S., 1942, Specificity of proteolytic enzymes. In *Advances in Enzymology*, 2: 49-98.
23. NORTHROP, J. H., 1939, *Crystalline Enzymes*. Columbia Univ. Press.
24. JAOUES, L. B., 1943, The reaction of heparin with proteins and complex bases. *Biochem. J.*, 37: 189-195.
25. FERGUSON, J. H., 1944, Observations on the alterations of blood platelets as a factor in coagulation of the blood. *Amer. J. Physiol.*, 108: 670.
26. Results not yet published.

“PORROCAECUM SULCATUM” (RUDOLPHI, 1819) (Nematoda, Ascaroidea) ¹

J. F. TEIXEIRA DE FREITAS e HERMAN LENT

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 13 figuras no texto)

Em agosto de 1941 recebemos da Fundação Rockefeller um exemplar vivo de tartaruga marinha — *Chelone mydas* (L.) — , adquirido no Mercado da Cidade do Rio de Janeiro e, certamente, proveniente da Baía de Guanabara.

A necrópsia encontramos muitos exemplares de um Ascarídeo, todos eles presos à parede do estômago, concentrados em determinada região do órgão, que se apresentava macroscopicamente lesado (fig. 1), cujo estudo anátomo-patológico foi confiado ao Dr. A. PENNA DE AZEVEDO e revelou gastrite crônica e aguda com exsudado fibrino-purulento e presença de ovos de helmintos.

O estudo dos exemplares colecionados mostrou tratar-se da espécie *Porrocaecum sulcatum* (Rud., 1819) e o material colecionado continha o helminto em graus variáveis de crescimento. Por estes motivos resolvemos redescrever e figurar com detalhe esta espécie de RUDOLPHI:

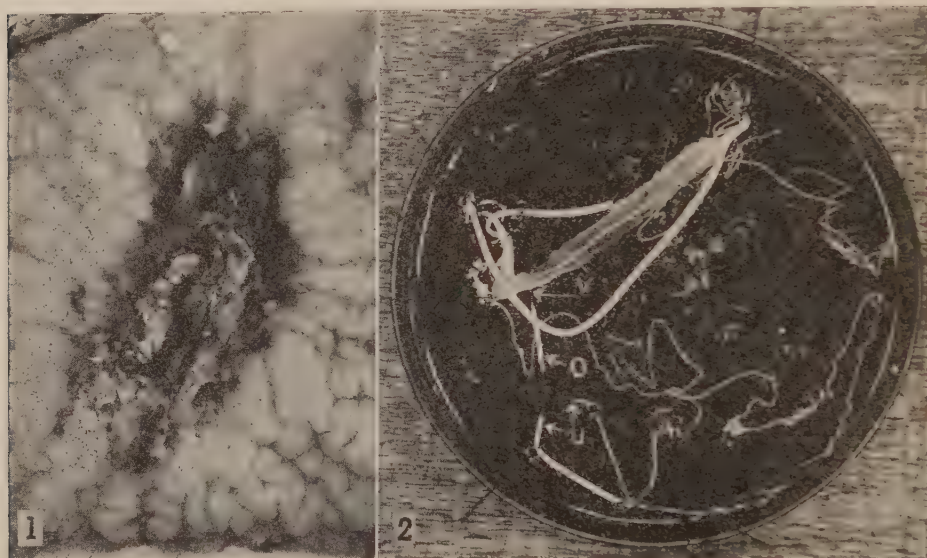
Comprimento — Machos 40,4 a 100,0 mm.; fêmeas 63,2 a 105,0 mm.

Largura — Machos 0,59 a 1,3 mm.; fêmeas 0,87 a 2,01 mm.

Corpo de coloração branca em vida. Cutícula estriada transversalmente e possuindo, entre as estrias transversais, outras, dispostas no sentido longitudinal. Extremidades atenuadas, principalmente a posterior. Bôca circundada por três lábios bem desenvolvidos e três interlábios; aqueles possuem as margens guarnecidas de pequenos dentes e estes possuem as margens lisas. Lábio dorsal medindo 0,17 a 0,36 mm. de comprimento por 0,19 a 0,40 mm. de largura nos machos e 0,26 a 0,49 mm. por 0,23 a 0,43 mm. nas fêmeas; apresenta duas papilas laterais situadas anteriormente e, aproximadamente no meio das mar-

¹ Recebido para publicação a 2 de maio de 1946.

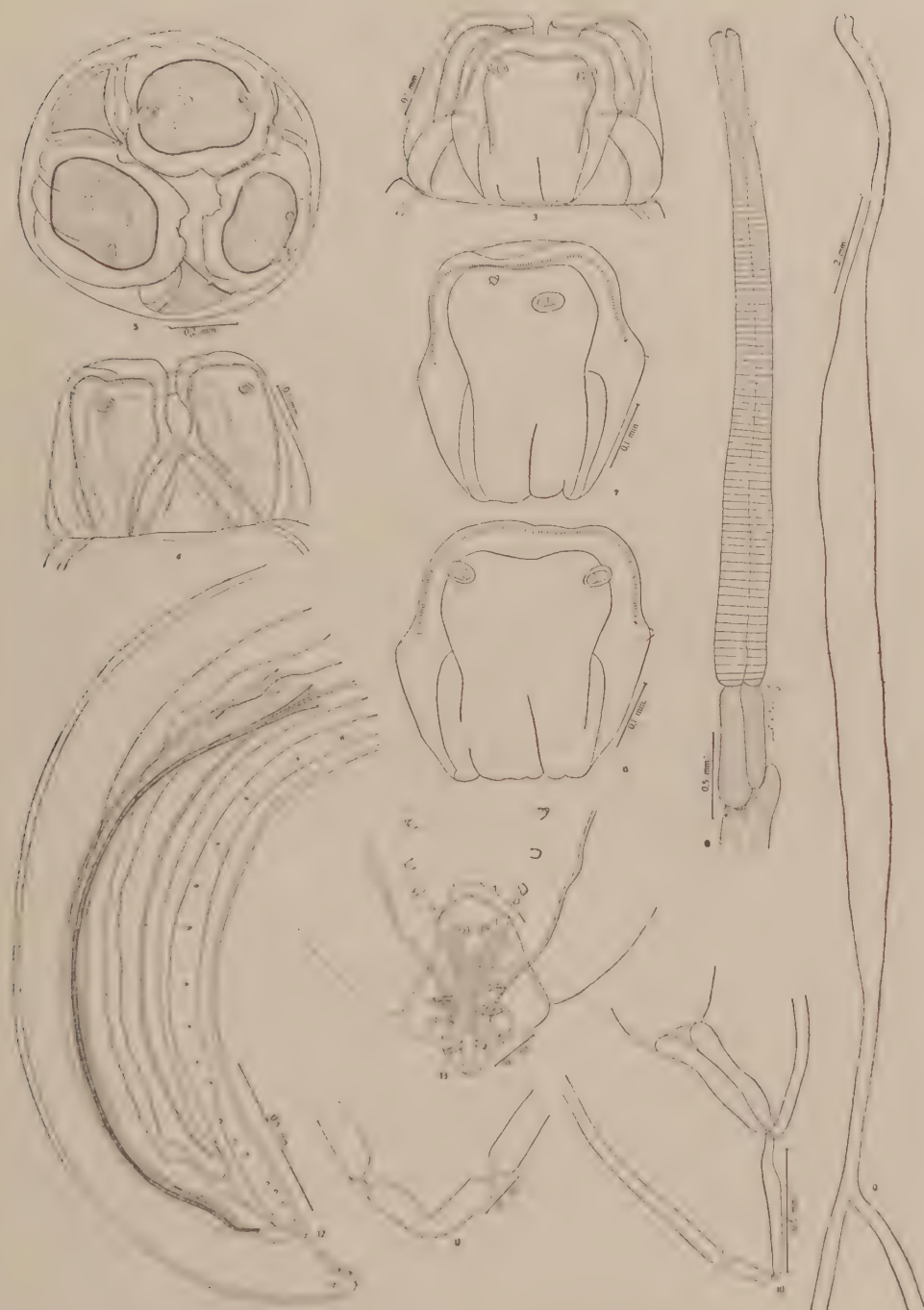
gens laterais, duas saliências cônicas, de aspecto papiliforme. Lábios látero-ventrais com duas papilas, das quais uma grande e outra pequena, ambas situadas na região anterior, sendo aquela mais ventral que esta; possuem ainda como o lábio dorsal, as duas saliências papiliformes látero-marginais. Medem os lábios látero-ventrais 0,19 a 0,41 mm. de comprimento por 0,22 a 0,45 mm. de largura nos machos e 0,25 a 0,49 mm. por 0,22 a 0,43 mm. nas fêmeas. Interlábios com 0,10 a 0,18 mm. de comprimento por 0,11 a 0,22 mm. de largura nos machos e 0,14 a 0,26 mm. por 0,17 a 0,35 mm. nas fêmeas. Lábios e



Porrocaecum sulcatum (Rudolphi, 1819) — Fig. 1: Aspecto macroscópico da lesão da mucosa do estômago de *Chelone mydas* (L.). Fig. 2: Fêmea dissecada (V, vulva; O, ovector; U, útero). Originais.

interlábios separados do corpo por um sulco mais ou menos profundo. Esôfago com 3,55 a 7,54 mm. de comprimento por 0,30 a 0,57 mm. de maior largura nos machos e 5,26 a 10,05 mm. por 0,43 a 0,87 mm. nas fêmeas. Ventrículo presente, mais longo que largo, medindo 0,65 a 1,17 mm. de comprimento por 0,25 a 0,43 mm. de largura nos machos e 0,84 a 1,17 mm. por 0,37 a 0,50 mm. nas fêmeas. Intestino cilíndrico, retilíneo, de paredes espessas. Ceco intestinal presente, curto, com 0,16 a 0,26 mm. de comprimento por 0,10 a 0,15 mm. de largura nos machos e 0,30 a 0,50 mm. por 0,15 a 0,40 mm. nas fêmeas. Anel nervoso situado a 0,60 a 1,24 mm. da extremidade anterior nos machos e a 0,76 a 1,16 mm. nas fêmeas. Papilas cervicais globosas, não salientes, de difícil observação, distando da extremidade cefálica 0,66 a 1,44 mm. nos machos. Asas laterais ausentes. Poro excretor difícil de evidenciar, situado a 0,78 a 0,83 mm. da extremidade anterior nos machos e a 1,13 mm. nas fêmeas, distâncias estas tomadas nos exemplares menores. Musculatura polimiária.

Fêmeas didelfas, opistodelfas, ovíparas, com abertura vulvar pequena, de lábios não salientes, situada a 19,03 a 40,03 mm. da extremidade anterior. Ovector longo, dirigido para trás, com cerca de 13,76 mm. de comprimento,



Porrocaecum sulcatum (Rudolphi, 1819) — Fig. 3: Lábios do macho, vista dorsal; fig. 4: lábios do macho, vista ventral; fig. 5: lábios da fêmea, vista de frente; fig. 6: lábio dorsal do macho; fig. 7: lábio ventro-lateral do macho; fig. 8: porção anterior do aparelho digestivo; fig. 9: ovejector; fig. 10: extremidade posterior da fêmea, vista lateral; fig. 11: ápice caudal da fêmea, vista ventral; fig. 12: extremidade posterior do macho, vista lateral; fig. 13: cauda do macho, vista ventral. Originais.

sendo 0,43 mm. para a vagina e o restante para o vestíbulo. A porção vestibular do ovejetor pode receber os ovos de um ramo uterino, em sua quase totalidade, de modo a se apresentar dilatada na região média, tendo, então, o aspecto de um fuso, podendo se confundir com um dos úteros. Ramos uterinos, geralmente com poucas sinuosidades, quase retilíneos, dirigidos para trás. Ovários muito longos e enovelados, situados em grande parte na região posterior do corpo, a uma distância variável do nível da abertura anal. Ovos com casca fina e levemente rugosa; medem 0,084 a 0,088 mm. de comprimento por 0,050 a 0,059 mm. de maior largura. Intestino terminado por um reto que mede 0,36 a 0,66 mm. de comprimento. Abertura anal situada a 0,41 a 0,53 mm. da ponta da cauda. Extremidade posterior atenuada, com um par de papilas laterais postanais, situado a 0,16 a 0,18 mm. do ápice da cauda.

Machos com espículos iguais, de base alargada e ponta afilada, e que medem 1,51 a 3,15 mm. de comprimento, sendo envolvidos por nítida bainha transparente e lisa. Gubernáculo ausente. Cloaca pequena. Tubo genital dirigido para diante; testículo com numerosas alças que terminam, geralmente, a grande distância do nível do fim do esôfago. Abertura anal ampla, situada a 0,22 a 0,28 mm. da ponta da cauda. Extremidade posterior atenuada, com asas caudais relativamente curtas. Papilas caudais presentes, em número de 53 a 71 pares pré-anais e de 6 pares post-anais. As papilas pré-anais são fracamente pedunculadas, de disposição ventro-lateral e vão diminuindo de tamanho e sendo mais espaçadas entre si à proporção que se afastam da abertura anal. Dos 6 pares post-anais, o primeiro é constituído por papilas sésseis, situadas logo atrás do anus; os cinco restantes são representados por papilas pedunculadas, grandes. A superfície ventral da cauda, na região mediana e do primeiro par de papilas post-anais para trás, é recoberta de pequenas escamas fracamente quitinizadas. Ápice caudal puntiforme.

Habitat — Estômago de *Chelone mydas* (L.)

Proveniência — Rio de Janeiro, D. F., Brasil.

BIBLIOGRAFIA

- RUDOLPHI, C. A., 1819, *Entozoorum Synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi*. X + 811 pp., 3 tabs., Berolini.
- SCHNEIDER, A., 1866, *Monographie der Nematoden*, VIII + 357 pp., 130 figs., 28 tafs., Berlin.
- STOSSICH, M., 1895, Notizie helmintologiche. *Boll. Soc. Adriat. Sci. nat. Trieste*, 16: 33-45, tavs. 4-6, 37 figs.
- STOSSICH, M., 1896, Il genere *Ascaris* Linné. *Boll. Soc. Adriat. Sci. Nat. Trieste*, 17: 9-120.
- YORKE, W. & MAPLESTONE, P. A., 1926, *The Nematode Parasites of Vertebrates*, XI + 536 pp., figs. 1-307, J. & A. CHURCHILL, London.

RECHERCHES SUR L'ATTAQUE ÉPILEPTIFORME PRODUITE PAR LE REFROIDISSEMENT BRUSQUE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE (CRYOÉPILEPSIE)

Huitième mémoire — Nouvelles déterminations de la période latente ¹

MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA et M. VIANNA DIAS

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Avec 4 figures)

Nous avons signalé dans un mémoire antérieur (1) que la technique employée dans nos expériences laisse à désirer quand il s'agit d'avoir des valeurs précises de la période latente en fonction de la température du bain. Après une grande série de déterminations qui ont donné des résultats intéressants (2), nous avons compris que l'étude du phénomène pourrait comporter plus de précision qu'on ne le croyait au début des recherches. Nous nous sommes proposés alors de perfectionner la technique, en supprimant ou en réduisant au minimum quelques causes d'erreur.

Parmi ces causes d'erreur, nous avons signalé la température du bain. Elle n'était pas sensiblement constante et, d'autre part, l'indication du thermomètre ne correspondait pas exactement à la température à laquelle était soumise la colonne vertébrale plongée dans le bain de Ringer. En particulier, l'une des faces de la préparation restait en contact avec la paroi de l'appareil, ce qui réduisait la précision des mesures. Un nouveau dispositif que nous décrirons sommairement nous a permis de perfectionner sensiblement ces points.

TECHNIQUE

Nous décrirons d'abord la technique employée dans les expériences où la température du bain était au-dessus de 0° C. Le petit appareil antérieurement décrit fut remplacé par un flacon Dewar-D'Arsonval (Thermos) (fig. 1),

¹ Reçu le 20 Mars 1946.

d'une capacité d'un litre et demi, ayant une large ouverture supérieure. Ce flacon, rempli jusqu'au bord de la solution de Ringer, constitue le bain réfrigérant. Dans deux supports placés à côté du flacon, on installe des curseurs destinés à recevoir des pinces à dissection dont les branches horizontalement placées passent par dessus les bords du flacon. Les vis des curseurs en pressant sur les branches des pinces les serrent l'une contre l'autre. Ces pinces servent à maintenir la préparation moelle isolée-train postérieur. Les deux

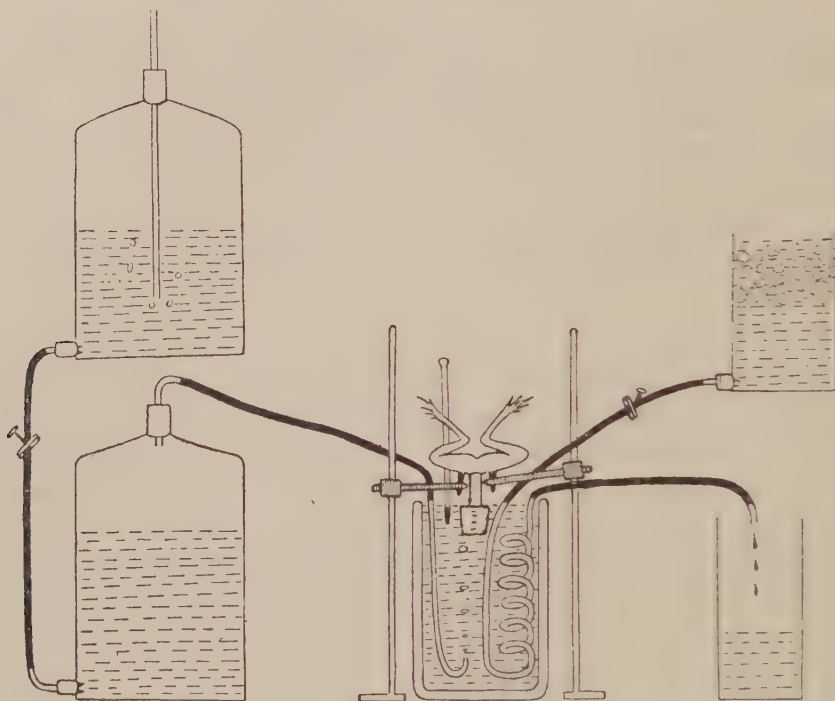


Fig. 1 — Dispositif pour la détermination de la période latente de l'attaque de cryoépilepsie. V. la description dans le texte.

os iliaques sont introduits de haut en bas, chacun dans la pince correspondante, de manière telle que le train postérieur reste en haut et la colonne vertébrale suspendue par les nerfs pend verticalement en bas. Elle plonge donc dans le bain, n'ayant aucun contact avec les parois du flacon ou les objets voisins. Les branches des pinces doivent être enveloppées par un tube en caoutchouc. En effet, comme nous le verrons, le bain sera soumis à une certaine agitation destinée à maintenir l'uniformité de la température. La colonne vertébrale, flottant dans le bain, vient parfois se mettre en contact avec la pince et on observe alors des contractions des pattes dues à la fermeture du circuit propre de la préparation (contractions de Galvani). Ces contractions, dues à de véritables excitations électriques, altèrent profondément les résultats des expériences. La protection par les tubes en caoutchouc les évite, à condition que les deux branches de la pince soient placées dans

un même tube courbé, en supprimant tout contact de la partie métallique de la pince, soit avec la préparation, soit avec le bain.

Dans le flacon on installe une serpentine en verre, parcourue par un courant d'eau salée et glacée, venant d'un flacon rempli d'eau, de glace et de sel. Une pince à vis permet de régler le débit de l'eau.

Pour avoir une température homogène, le liquide contenu dans le flacon est constamment parcouru par des bulles d'air sortant du bout effilé d'un tube en verse. Ce tube est relié à un grand flacon contenant de l'air sous une pression constante. En effet, ce flacon reçoit l'eau qui s'écoule d'un flacon de Mariotte placé à une hauteur convenable. Un thermomètre dont le bulbe se trouve placé au même niveau que la colonne vertébrale donne la température du bain refroidi à laquelle celle-ci est soumise.

Dans les expériences faites au-dessus de 0° C, on employait le liquide de Ringer. Dans les expériences où la température descendait au-dessous de 0° C, la solution de Ringer était remplacée par une solution concentrée de NaCl. Quand on veut employer des températures très basses il devient difficile de les obtenir avec le flacon de Dewar-D'Arsonval. Les expériences étaient faites dans un flacon de Becker installé à l'intérieur d'un grand vase cylindrique rempli d'un mélange de glace et sel. On peut obtenir la température voulue en réglant la hauteur du mélange réfrigérant. Les autres parties de l'appareillage étaient celles que nous avons ci-dessus décrites.

Toutes les expériences furent faites avec le *Leptodactylus ocellatus* des environs de Rio de Janeiro.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. *Influence de la grandeur de la colonne vertébrale.* — Dans un mémoire précédent, nous avons vu que, toutes autres conditions égales, la période latente P_l est proportionnelle à la puissance $2/3$ du poids de la colonne vertébrale P_m .

Avec la nouvelle technique, deux séries d'expériences furent consacrées à cette question. Chaque série était faite en une seule journée, la température ambiante se maintenant sensiblement constante, la température du bain ayant varié au maximum d'un dixième de degré. La première série (le 10 Janvier 1945) fut faite à une température du bain de $1^{\circ},15$; la deuxième (12 Janvier), à $4^{\circ},15$. Nous avons calculé par la méthode des moindres carrés les équations de la forme:

$$P_l = a \cdot P_m^{\beta}$$

et nous avons trouvé:

10 Janvier	$P_l = 0,465 \cdot P_m^{0,66}$
12 Janvier	$P_l = 0,570 \cdot P_m^{0,69}$

Dans la première série P_m a varié entre 0,45 et 8,07 g.; dans la seconde série entre 0,51 et 6,44.

Naturellement le coefficient α dépend de la température du bain. Le coefficient β est pratiquement égal à $2/3$. La seconde série d'expériences a présenté une dispersion des points expérimentaux

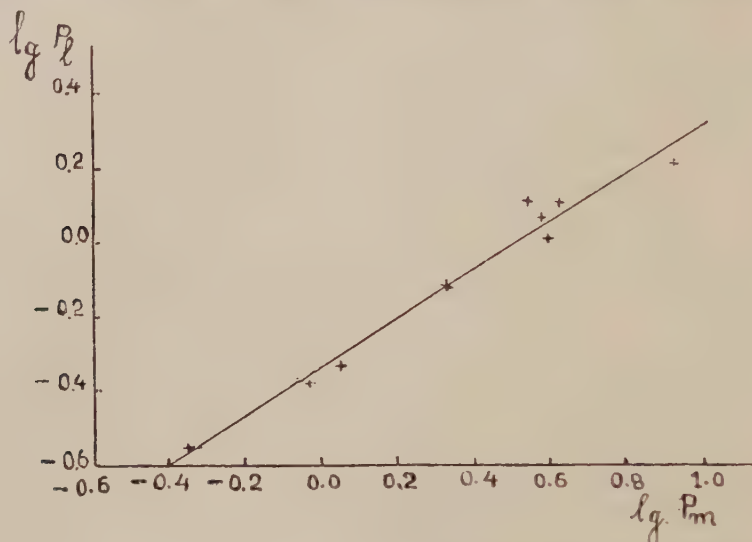


Fig. 2 — Droite, dont la pente est égale à 0,66, qui représente les valeurs de $\lg P_l$ rapportées aux valeurs de $\lg P_m$.

bien plus grande que la première ce qui, en grande partie, est dû à la température plus élevée du bain. Nous donnons dans la fig. 2 la représentation graphique des valeurs de $\lg P_l$ rapportées aux valeurs de $\lg P_m$. La pente de la droite est 0,66. Nous continuerons donc à prendre l'expression $P_l P_m^{-2/3}$ comme l'expression de la période latente rapportée à l'unité de poids de la colonne vertébrale.

II. *La période latente en fonction de la température du bain réfrigérant.* — Nous avons réalisé 106 déterminations de la période latente dans les conditions normales et utilisant la préparation habituelle moelle isolée-train postérieur. La température extérieure donnée par un thermomètre humide (c'est la température la plus proche de celle de la moelle au moment où elle est plongée dans le bain froid) fut, en moyenne, de $25^{\circ}7$, avec un maximum de $26,6$ et un minimum de $24,1$. Ces variations ont une influence négligeable sur les résultats et on peut prendre $25,7$ comme température initiale.

La température du bain a varié entre $-8^{\circ}3$ et $+8^{\circ}9$. Aux températures $8^{\circ}6$; $8,8$; $8,85$; $8,9$, l'attaque ne s'est pas produite. La li-

mite supérieure $8^{\circ},5$ est donc la même que l'on avait précédemment trouvée.

La fig. 3 représente ces périodes latentes en fonction de la température du bain T_b . Si l'on compare cette figure avec la courbe de la fig. 1 de la série étudiée dans un mémoire antérieur (2), on voit qu'elles sont semblables l'une à l'autre. On remarque, cependant,

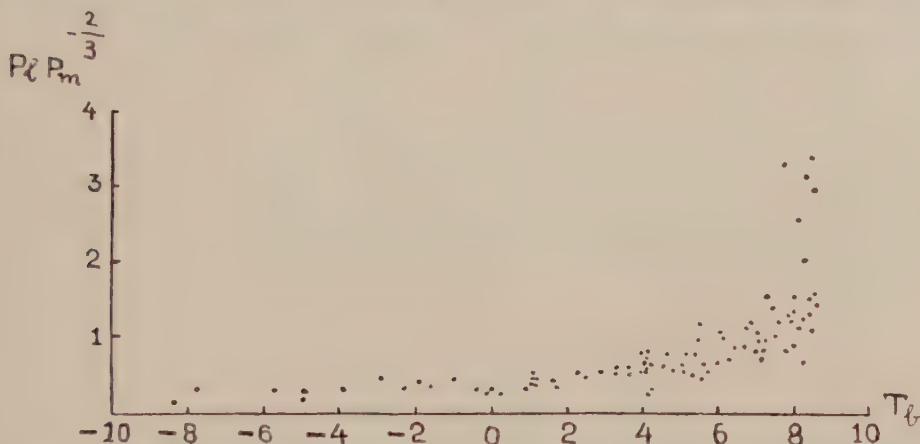


Fig. 3 — Points représentatifs de la période latente réduite à l'unité de poids de la colonne vertébrale, en fonction de la température du bain réfrigérant T_b .

une dispersion beaucoup plus réduite pour le cas des températures plus élevées dans la série nouvelle, ce qui permettra une plus grande précision de l'analyse de la courbe.

III. *La période latente des tremblements.* — Nous avons antérieurement défini la période latente de l'attaque comme étant

“l'intervalle de temps entre le moment où la moelle est soumise au refroidissement et l'instant où l'attaque commence d'une manière nette, c'est-à-dire, quand les tremblements de la période initiale deviennent assez forts et la phase tonique va commencer” (2).

Dans la série d'expériences qui fait l'objet de ce mémoire-ci, nous avons soigneusement noté le moment où les premiers tremblements se montrent en conséquence du refroidissement. On peut parler d'une période latente des tremblements, comme on définit la période latente de l'attaque. Il est évident que la période latente des tremblements est plus petite que celle de l'attaque proprement dite.

Dans les deux séries d'expériences qui ont servi à déterminer la forme de la relation entre la période latente et la grandeur de la colonne vertébrale, nous avons cherché s'il y a une relation semblable

pour le cas de la période latente des tremblements. Les résultats sont moins précis dans ce dernier cas. Tout ce que l'on peut dire, c'est que P_l croît avec P_m (poids de la colonne vertébrale) et, très probablement, est proportionnelle à une certaine puissance de P_m . Mais au lieu de trouver ici la puissance $2/3$, nous avons trouvé des valeurs plus basses, proches de 0,50. La période latente des tremblements se-

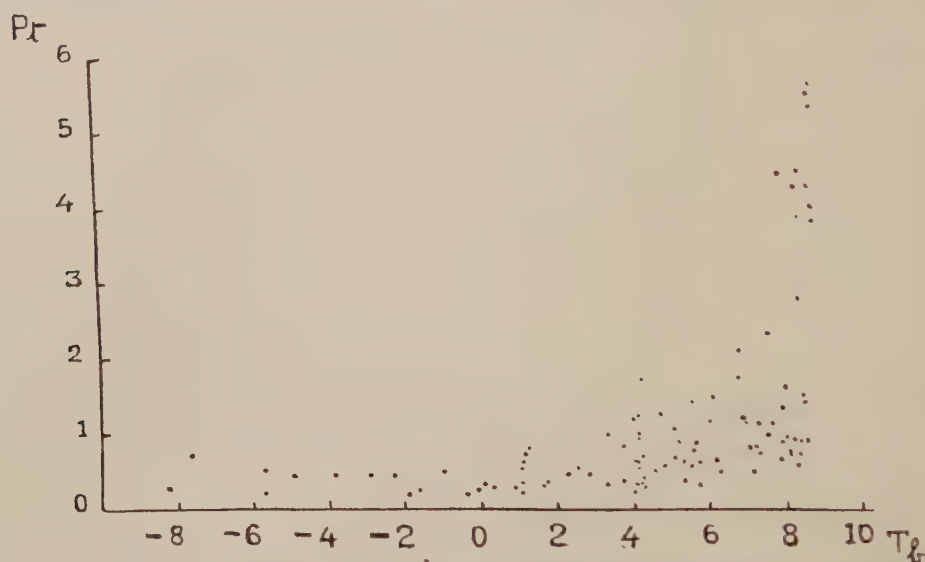


Fig. 4 — Points représentatifs de la période latente des tremblements initiaux de l'attaque en fonction de la température du bain réfrigérant.

rait donc, toutes autres conditions maintenues constantes proportionnelle à la racine carrée de P_m . Il est difficile de décider si ce résultat correspond vraiment à la réalité ou s'il découle des conditions de l'expérience. Nous renouons donc à réduire à l'unité de poids les valeurs de la période latente des tremblements et nous nous bornons à reproduire dans la fig. 4 les valeurs réelles de cette période en fonction de la température T_b du bain. On voit que la courbe obtenue est semblable à celle des périodes latentes de l'attaque. La dispersion des points est sensiblement plus grande, mais il ne faut pas oublier qu'en bonne partie cela est dû au fait que l'on n'a pas fait des corrections de poids. La limite supérieure est la même pour les deux cas.

L'analogie entre les deux courbes soulève une question assez importante: Les tremblements et l'attaque complète représentent des réactions d'un même élément produites à des températures différen-

tes, ou des réactions d'éléments différents qui se produisent à la même température? Dans le premier cas, on peut concevoir qu'un même ensemble de cellules médullaires réagissent par des décharges d'un type déterminé quand, par le refroidissement, la température descend à un certain niveau et par des décharges à rythme accéléré quand une autre température plus basse est atteinte. Dans le second cas, des groupes cellulaires différents arriveraient à la température critique à des moments différents. Cette question sera abordée dans d'autres travaux.

En tout cas, l'analogie des deux courbes permettra d'aborder avec fruit l'étude systématique de la période latente dans les cas où il n'y a pas de distinction nette entre la phase initiale des tremblements et la phase tonique de l'attaque. C'est le cas des grenouilles de Montévidéo et de Pernambuco, comme nous l'avons signalé dans un autre mémoire.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Dans ce mémoire nous décrivons une technique nouvelle pour la détermination de la période latente de l'attaque de cryoépilepsie.

2. La période latente est proportionnelle à la puissance $2/3$ du poids de la préparation de la colonne vertébrale détachée du corps.

3. Nous donnons une courbe des variations de la période latente en fonction de la température du bain.

4. Nous avons étudié systématiquement la période latente des tremblements qui précèdent l'attaque elle-même. La courbe obtenue est semblable à celle de la période latente de l'attaque, mais placée à un niveau plus bas. La limite supérieure de température est sensiblement la même pour les deux cas.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Nesta memória descrevemos uma técnica nova para a determinação do período latente do ataque de crioepilepsia.

2. O período latente é proporcional a potência $2/3$ do peso da preparação da coluna vertebral destacada do corpo.

3. Foi apresentada a curva das variações do período latente em função da temperatura do banho.

4. Estudámos sistematicamente o período latente dos tremores que precedem o ataque propriamente dito. A curva obtida é semelhante a do período latente do ataque, mas colocada em nível mais baixo. O limite superior de temperatura é sensivelmente o mesmo nos dois casos.

BIBLIOGRAFIA

1. OZORIO DE ALMEIDA, M. 1943, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière (Cryoépilepsie). Septième mémoire. Essai d'interprétation des résultats donnés par la détermination de la période latente et de la limite supérieure de température. *Rev. Brasil. Biol.*, 3 (4): 395-402.
2. OZORIO DE ALMEIDA, M., MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M., 1942, Recherches sur l'attaque épileptiforme produite par le refroidissement brusque de la moelle épinière (Cryoépilepsie). Mémoire quatrième. La période latente de l'attaque chez le "*Lepidodactylus ocellatus*" des environs de Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Biol.*, 2 (4): 455-471.

SÔBRE O GÊNERO "PHATNOMA", COM A DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE E A LISTA DE SUAS ESPÉCIES (Hem. Tingidae) ¹

OSCAR MONTE

Instituto Biológico, S. Paulo

(Com 8 figuras no texto)

O gênero *Phatnoma* Fieber, 1844 (*Ent. Mon.*, 30 e 57) erigido para a espécie *laciniata* Fieber, é de distribuição mundial, excetuando-se o continente europeu, segundo a relação que apresentamos.

Das nove espécies descritas para a fauna americana, o Brasil possui 5 delas incluindo-se a nova espécie aqui descrita.

Várias espécies descritas neste gênero foram transferidas posteriormente para outros gêneros. Referimo-nos a outros gêneros porque surgiu uma questão entre BERGROTH e DISTANT sobre a situação sistemática de algumas espécies que, conforme o parecer do primeiro dos entomologistas deviam ser incluídas no gênero *Gonycentrum* Bergroth, 1898 proposto para substituir *Teleia* Fieber, 1844 (*Ent. Mon.*: 55), como nome ocupado por Lepidoptera.

DISTANT, não accitando a proposta de BERGROTH, formou para as suas contestadas espécies o gênero *Sinalda*, 1903 (*Trans. S. Afr. Philos. Soc.*, 14: 426), e defendendo seu ponto de vista escreveu:

"Allied to *Phatnoma* by the raised transverse lines to the discoidal and subcostal areas of the elytra, but differing by the non-dilated lateral areas of the pronotum, which are more or less convex, not spinously amplified; the elytra are also relatively narrower.

I had intended, at least for the present, to consider the genus now proposed as a section of *Phatnoma*, from which it differs practically by the above characters alone. That me-

¹ Recebido para publicação a 1 de fevereiro de 1946.

thod is now rendered inadvisable by the remarks of my vigilant critic Dr. Bergroth, who has stated definitely that three of my species thus treated must be placed in the genus (Oriental according to present knowledge) *Gonycentrum* (*Teleia* Fieb.). That, however, is an error which the figures should have prevented, for *Gonycentrum* is without the transverse raised lines to the elytra, and thus the foundation of a new genus becomes necessary to prevent the confusion by my friend's proposed correction?"

E posteriormente comentou em *Fauna India Rhynchota*, II (1): 125. 1903:

"Bergroth (Ann. Soc. Ent. Belg., VIII, p. 297, 1903) has proposed the incorporation in this genus of some African species described by myself in the genus *Phatnoma*; but this is clearly incorrect, as the characters are nearer those of *Phatnoma*, on account of the presence of raised transverse lines to the elytra. I have since founded a new genus *Sinalda* for their reception."

Sem dúvida DISTANT estava convicto de suas assertivas, e voltou à questão para que os elementos que foram postos em discussão ficassem bem claros, e não concorressem em futuro para dificultar o assunto. Em seu trabalho *Synonymical Notes* (*Ann. Mag. Nat. Hist.*, 12 (7): 474, 1903), escreveu:

"Dr. Bergroth (Ann. Soc. Ent. Belg. VIII, 1903, p. 297) has referred to four species of Tingitidae from South Africa which I recently described under the genus *Phatnoma*, and states that three of these belong to the allied genus *Gonycentrum* (*Teleia*, Fieb. nom. preocc.). He also writes: "la structure du pronotum est la seule différence valable entre ces deux genres". In these statements I do not think the writer has shown his usual acumen. The structure of the pronotum is not the only good dividing character between these two genera; the transverse raised lines to the discoidal and subcostal areas of the elytra constitute a distinct character of *Phatnoma* not found in *Gonycentrum*, besides which the structure of the head in both genera, as shown by Fieber's excellent figures, is another point of division.

The three species I have described and figured under the genus *Phatnoma* cannot therefore be placed in *Gonycentrum*, as Dr. Bergroth definitely states, and if they are to be separated from the first named it must be by the construction of

a new genus. To separate species from a genus to which they have most affinity and place then in another to which they do not belong tends rather to obscurantism than to correction."

Que seja do nosso conhecimento BERGROTH não voltou à questão, o que leva crer ter aceito como boas as razões apresentadas por DISTANT. E pelo que se lê das diagnoses genéricas, a seguinte chave será proposta:

1. Cabeça com espinhos erectos; paranotos largos..... *Phatnoma* Fieber, 1844
Cabeça sem espinhos erectos; paranotos muito estreitos.... 2
2. Áreas discoidal e subcostal sem nervuras salientes e transversais *Gonycentrum* Bergroth, 1898
Áreas discoidal e subcostal com nervuras salientes e transversais *Sinalda* Distant, 1903

Estudando um exemplar de *Phatnoma* que me foi oferecido pelo sr. JACINTO GUERIN, e que abaixo descrevemos como nova espécie, verificamos que a estrutura do pronoto: o formato dos paranotos: a maior ou menor largura do bordo anterior dos paranotos, isto é, a distância que vai da linha limitrofe do pronoto ao espinho anterior; a disposição da saliência anterior; o maior ou menor prolongamento das carenas laterais até ao collar; a parte basal dos paranotos, junto ao ângulo humeral, apresentam bons elementos para u'a melhor diferenciação das espécies.

Revendo o material que temos em coleção, apresentamos os desenhos das espécies que nela estão representadas, e dos tipos de *ecuadoris* Dk. e *barberi* Dk., que devemos à gentileza do Dr. REECE I. SAILER, do United States National Museum, de Washington, em cujas coleções estão os dois tipos depositados. Pelos desenhos poder-se-á fazer uma mais perfeita idéa destes elementos, e dos quais nos prevalecemos para a composição da chave que adiante apresentamos. Infelizmente, como era do nosso desejo, não podemos contar com material ou desenhos das outras espécies, especialmente das da fauna americana. Todavia, estudando-se os desenhos das espécies que não possuímos, verifica-se que são bem típicos os paranotos em *laciniata* Fieb., vendo-se o prolongamento das duas saliências, formando-se entre elas uma forte reentrância; bem mais característico é o formato dos paranotos de *humeralis* Distant, que apresenta três saliências, e que a meu ver merece um estudo mais detalhado no material típico; em *takasago* Takeya, o pronoto é muito estreitado, alargando-se os paranotos na sua parte média, os quais apresentam dois espinhos bem salientes.

Das outras espécies nada podemos adiantar, porque as descrições não são suficientes para se fazer uma idéia real de suas estruturas.

Nos desenhos das espécies americanas, os paranotos de *annulipes* Champion são inconfundíveis, assim como os de *vernoniae* Dk. & Hbl., porém, o melhor característico desta última espécie está no alargamento do pronoto, estreitando bastante os paranotos na sua parte basal. Os paranotos de *marmorata* Champ., *ovata* Champ. e *maculata* n. sp. são mui semelhantes, porém, em *ovata*, a saliência apical é quase nula, e a parte basal estreitada, enquanto que esta é alar-

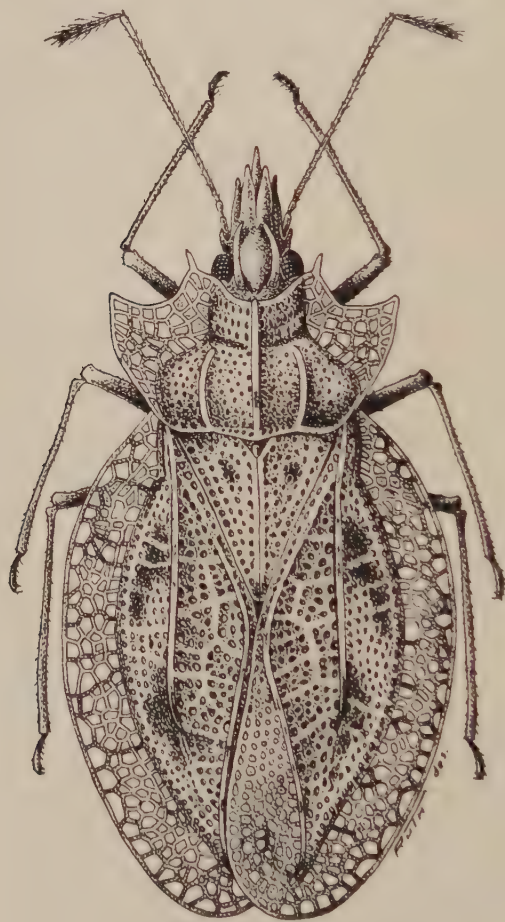


Fig. 1 — *Phatnoma maculata* n. sp., desenho total.

gada nas outras duas. Em *maculata* n. sp., a margem anterior é mais estreita e o pronoto mais longo e mais largo, do que em *marmorata*, e as carenas laterais não alcançam o collar como nesta última espécie.

Os elementos diferenciais de *amazonica* Dk. & Hbl. são mais de colorido, do que de qualquer outro carater específico. Para *varians* Drake os paranotos são:

"angularly dilated before the middle as well as in front, becoming narrower behind, the angular anterior dilation ending in a short spine, and composed of three rows of areolae in front",

e o autor não a aproximou, quando a descreveu, de nenhuma das espécies até então descritas. Em *marmorata*, as carenas laterais alcançam o colar e a abertura entre as duas saliências é bem mais profunda, e os dois espinhos bem mais salientes do que em *barberi* Drake. Em *ecuadoris* Drake, a largura entre a saliência apical e a base da margem anterior dos paranotos é muito estreita (mais ou menos como em *maculata* n. sp.), porém a parte basal é muito estreita (como em *vernoniae* Dk. & Hbl.).

As considerações aqui feitas sugerem que as espécies de *Phatnoma*, não devem ser publicadas sem um desenho esquemático do pronoto e paranotos, salvo condições outras, em que apareça outro elemento decisivo. A apresentação dêste desenho torna sem dúvida mais fácil a tarefa dos que tiverem de estudar espécies do gênero *Phatnoma*.

Com os elementos acima discutidos apresentamos a seguinte chave² para as espécies americanas:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. Bordo anterior dos paranotos mais largo que a metade do bordo anterior do colar..... | <i>annulipes</i> Champ. |
| Idem, mais estreito ou de igual comprimento..... | 2 |
| 2. Região basal dos paranotos (junto a parte humeral) estreita..... | 3 |
| Idem, larga | 5 |
| 3. Espinho apical do paranoto pouco desenvolvido..... | <i>orata</i> Champ. |
| Espinho apical do paranoto bem desenvolvido..... | 4 |
| 4. Parte lateral do pronoto com calosidade; bordo anterior dos paranotos com igual largura da metade do bordo anterior do colar..... | <i>vernoniae</i> Dk. & Hbl. |
| Idem, sem calosidades; idem, mais estreito..... | <i>ecuadoris</i> Drake |
| 5. Carenas alcançando o colar..... | <i>marmorata</i> Champ. |
| Carenas não alcançando o colar..... | 6 |
| 6. Bordo anterior dos paranotos mais largo do que a metade do.... | |
| bordo anterior do colar..... | <i>barberi</i> Drake |
| Idem, mais estreito..... | <i>maculata</i> n. sp. |

² Deixamos de incluir as espécies *amazonica* Drake & Hambl. e *varians* Drake, pela impossibilidade de obter melhores dados, além dos de suas diagnoses originais.

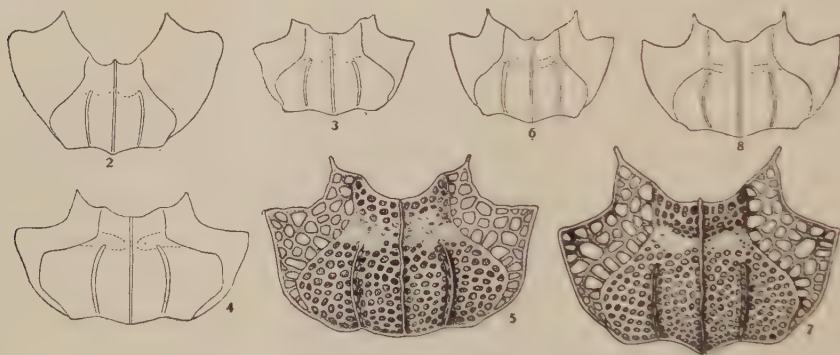
Phatnoma maculata n. sp.

(Figs. 1 a 8)

Castanho-claro, com máculas escuras na área subcostal, e duas outras pequenas e foscas, no clavo. Cabeça pardo-escura, coberta com pubescência clara, com sete espinhos. O par posterior curvo para baixo, delgado, claro, alcançando um pouco além do par seguinte, que é castanho-escuro, aclarado no ápice, grosso e afilado para a parte apical; o mediano do mesmo feitio que o par anterior, porém menos engrossado; o par anterior menor do que os outros, mais fino e chegando a metade do comprimento do par precedente.

Búcula profunda, larga e sinuosa na frente. Abertura rostral com as margens baixas, estrangulada junto ao 1º par de patas, depois alargando-se até as coxas do último par.

Rostro longo, castanho-claro, prolongando-se até a metade do abdômen, e guardado neste, numa excavação rasa.



Paranoto de: Fig. 2 — *Phatnoma annulipes* Champ.; fig. 3 — *P. ovata* Champ.; fig. 4 — *P. vernoniae* Dk. & Hbl.; fig. 5 — *P. ecuadoris* Drake; fig. 6 — *P. marmorata* Champ.; fig. 7 — *P. barberi* Drake; fig. 8 — *P. maculata* n. sp.

Antenas com os dois primeiros segmentos castanhos, sendo o primeiro levemente maior do que o 2º; o 3º amarelado e quatro vezes o comprimento do 4º; o último segmento escuro e coberto de pêlos claros.

Pronoto largo e trapezoidal; colo largo, trisseriado, com aréolas pequenas. Paranotos largos, no início bisseriado, depois 3-4 aréolas, arredondados atrás, no ângulo anterior com um espinho saliente e no posterior, disfarçadamente rombo; a margem anterior entre o colo e o espinho, muito estreita. As carenas laterais levemente curvadas, menos elevadas do que a mediana, com aréolas visíveis e não chegam à base do colo; a mediana alta, uniareolada, arqueada sobre o disco pronotal, ali duas de suas nervuras enegrecidas, profundamente concava na sua passagem do colo para o pronoto, sendo que na parte anterior as aréolas são muito mais distintas.

Escudo muito pequeno, quase escondido, com uma pequena elevação em anel.

Élitros largos, ovalados, arredondados no ápice; clavo triangular, largo, com duas pequenas manchas pardo-foscas na sua base; área discoidal com sete pequenas aréolas na sua maior largura, limitada das outras áreas por nervuras altas e largamente arcoladas, a parte discal desta área recortada de nervuras pouco salientes, como se vê na figura; a subcostal muito larga e inclinada, cortada por nervuras grossas e com 6-7 pequenas aréolas, nas partes anterior e posterior, com manchas pretas; área costal larga, ovalada, formada por carreiras irregulares, quase sempre com quatro aréolas, sendo as da margem externa, maiores.

Comprimento 3.91 mm.; largura 1.95 mm.

Holótipo (fêmea), S. Paulo (capital), colhido por J. GUÉRIN, em 23-9-1945, na coleção do autor.

É mais próxima de *P. marmorata* Champion, e desta perfeitamente distinta, pelo formato dos paranotos, pela disposição final dos élitros, muito mais estreitos em *maculata*, e pelas nervuras que cortam as áreas subcostal e discoidal. Diferencia-se de *barberi* Drake por ter o bordo anterior dos paranotos mais estreito do que a metade do bordo anterior do colar.

LISTA DAS ESPÉCIES DE *PHATNOMA*

TIPO: *laciniata* Fieber, 1844

Fauna Americana

- | | |
|--|---|
| 1. <i>amazonica</i> Drake & Hambl., 1944 — J. Wash. Ac. Sc., 34 (4): 120..... | 1 — Brasil (Pará) |
| 2. <i>annulipes</i> Champion, 1897—Biol. Centr. Amer., Rhynch. II: 4 | 2 — México, Guatemala
Panamá e Costa Rica |
| 3. <i>barberi</i> Drake, 1941 — J. Wash. Ac. Sc. 31 (4): 141..... | 3 — Colombia |
| 4. <i>ecuadoris</i> Drake, 1941 — J. Wash. Ac. Sc., 31 (4): 141.... | 4 — Equador |
| 5. <i>maculata</i> n. sp. | 5 — Brasil (S. Paulo) |
| 6. <i>marmorata</i> Champion, 1897 — Biol. Centr. Amer., Rhynch II: 3 (sin: <i>filetia</i> Gibson, 1919 — Trans. Amer. Ent. Soc., 45: 185; <i>spinosa</i> Gibson, 1919 — l. c.: 45: 185) | 6 — Brasil (Mato Grosso)
Panamá, C. Rica, Honduras, Trinidad |
| 7. <i>ovata</i> Champion, 1897 — Biol. Centr. Amer., Rynch. II: 4 | 7 — Brasil (S. Paulo), México e Guatemala |
| 8. <i>varians</i> Drake, 1922 — Mem. Carn. Mus., 9 (2): 352
var; <i>unicarinata</i> Drake, 1922 — l. c.: 353 | 8 — Guiana Francesa
— Guiana Francesa |
| 9. <i>vernoniae</i> Drake & Hambl., 1938 — Arq. Inst. Biol., 9:51 | 9 — Brasil (S. Paulo) |

Fauna extra-Americana

- | | |
|--|----------------------------------|
| 10. <i>costalis</i> Distant, 1909 — Ann. Soc. Ent. Belg., 53:113 | 10 — India, Ilhas Hainan (China) |
| 11. <i>humeralis</i> Distant, 1902 — Ann. Sth Afr. Mus., II:239 | 11 — Colonia do Cabo |
| 12. <i>laciniata</i> Fieber, 1844 — Ent. Mon.: 57 | 12 — India, Ceilão |
| 13. <i>maynei</i> Schout., 1916 — Rev. Zool. Afr., 4:289 | 13 — Congo Belga |
| 14. <i>pacifica</i> Kirkaldy, 1908 — Proc. Linn. Soc., Sydney, N. S. W. 33:363 | 14 — Fiji (ilhas) |
| 15. <i>takasago</i> Takeya, 1933 — Mushi, 6:32 | 15 — Formosa (ilha), India |

SUMMARY

ON THE GENUS "PHATNOMA," WITH DESCRIPTION OF A NEW SPECIES, AND A
CHECK LIST OF THE SPECIES

The author presents the description of a new species of *Phatnoma* from Brasil, together with notes upon other species of this genus. The study was undertaken to determine the exact relationship of the new species described to the known ones, and our attention has been directed towards other characters not used until now to classify species of this genus. The characters discovered have proved very useful to separate species.

The genus *Phatnoma* was erected by Fieber, having as genotype *laciniata* Fieb.; so far as is known, the genus occurs in all continents, save in the European.

Because of the great similarity of some of the species, the classification is now based upon the new characters, as may be seen from the key to the American species, excluding *amazonica* and *varians*, because the author could not get material for studies.

The check list of the species of the world is given with their geographic distribution.

Type in the author's collection.

AFTER STRETCH POTENTIATION OF MUSCULAR CONTRACTION IN MAMMALS (Preliminary report) ¹

J. PEREIRA JR.

Instituto Biológico, S. Paulo

(With one text-figure)

In the course of observations of drug action on guinea-pig striated muscle we have observed that the series of twitches following a short tetanus is stronger than the maximal contractions just preceding it

This phenomenon that was put in evidence by GUTTMAN, HORTON & WILBER (1936-1937) and ROSENBLUETH & MORISON (1937) has deserved a number of interpretations based upon the assumption that chemical substance liberated by a short tetanus can enhance the response of striate muscle to single shock.

GUTTMAN et al. points to the possibility of acetylcholine or adrenaline release by the interpolated tetanus; to ROSENBLUETH & MORISON, BROWN & EULER (1938) a mobilisation of diffusible ions of potassium affords an explanation to at least part of the fact.

By obtaining an enhancement of contractions after a stretching of the muscle of the same order as the post-tetanic one, we feel sure to split this post-tetanic phenomenon in two phases: *a*) one evanescent after a few contractions and probably chemical in nature (potassium, acetylcholine etc.); *b*) a more permanent phase of potentiation lasting for various minutes and not explainable on the basis of liberation of chemical substances.

METHODS

Guinea-pigs were used anesthetised by urethane (10 mg./100g. body weight) of both sexes indifferently and weighting between 200 - 500g.

¹ Received for publication March 21, 1946

Presented at the February 8, 1946 session of the "Sociedade de Biologia de S. Paulo."

As the animal was sufficiently anesthetized the spinal cord was sectioned in almost all animals, between C_{VI} and L_{III} to prevent any action of different levels of the nervous system in this phenomenon. No influence was observed either nervous or of blood pressure level in the production of the phenomenon.

The animal so prepared was put on a small animal table where the lower extremity of tibia and peroneus were firmly clamped in position so as to allow the direction of contraction transmitted to the lever to exert in the habitual direction of contraction of the muscle. The tendon of the gastrocnemius or gastrocnemius and soleus were firmly tied by a waxed cotton thread so as to anchor a steel hook electrically insulated. By means of this hook a thin steel thread makes the connection between muscle and the lever, either isotonic or isometric.

The table where the animal rests is clamped firmly around a strong axis so as to permit one to impart a limited movement of rotation to the table and so the muscle may be submitted to a tension whose strength may be varied at will. This device will be fully described in a forthcoming paper.

The muscle was excited directly or through the nerve by induction shocks habitually maximal. Single shocks were controlled automatically by a mechanical device connected to the motor of the kymograph. Make and break shocks were used.

RESULTS

We can observe from fig. 1 the effect of traction in the potentiation of subsequent twitches.

The gastrocnemius was excited indirectly, but the same results we obtain by direct stimulation.

It is to be noted that the shocks used were always maximal so that the alterations after a stretch or tetanus cannot be explained by the supposition of idle muscular fibers getting into action by an enhanced excitability.

With a low initial tension (25-50 g.) the enhancement after a stretch or a short tetanus is clearly visible but after the potentiation is obtained by a stretch, a tetanus only gives a slight and evanescent potentiation of contractions.

With a high initial tension the potentiation tends to be abolished both to a stretch or a tetanus, and we can observe from fig. 1-A, C for stretching and B, D for tetanus that the relative strength of potentiation is very prone to become smaller as the initial tension grows higher.

The somewhat higher level obtained after a tetanus rapidly declines to a steady level as the one obtained with a stretch.

Three facts leads us to the conclusion of the double nature of this post-tetanic potentiation:

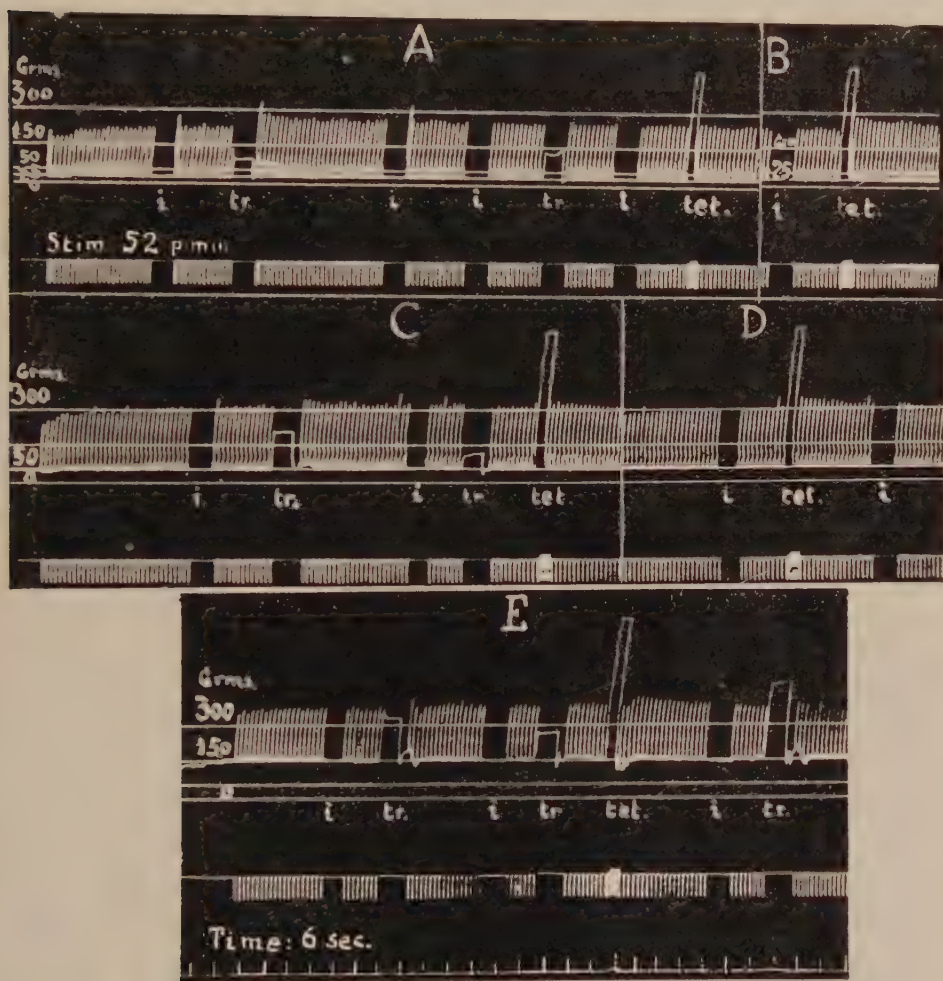


Fig. 1 — Guinea-pig, 500 g., male, October, 5.1945. Isometric contractions of gastrocnemius, indirectly stimulated through the sciatic nerve. Lever magnification 8 times. Medullary section at Dvnr. Between each section 8 minutes of rest with the muscle under 0 tension. i, 5 sec. interval; tr, 5 sec. traction on the muscle with various strengths: tet, 3 sec. tetanus. Make and break shocks with a Harvard inductorium and 6 volts (*A* and *B*: initial tension 25 g. Note the tetanus in *B* (after 8 minutes rest and excited about 1 minute) reproducing the potentiation seen in *A* by the traction. A second traction in *A* don't changes the strength of the phenomenon; the short rest of 5 sec. don't alters the situation before or after potentiation. *C* and *D*: initial tension 50 g. (See *A* and *B*). *E*: initial tension 150 g. It is to be noted the absence of potentiation at this level of muscle tension. The tetanus is nonobstant followed by the short evanescent phase of potentiation).

1) The extreme smallness (when it exists) of potentiation at high initial tensions (fig. 1-E).

2) The potentiation obtained after a stretch cannot be further enhanced by a tetanus. (Sometimes a tetanus gives a slight potentiation) (fig. 1-A-C.).

3) The great duration of the steady phase of enhancement, be it post-tetanic or after stretching.

This steady phase might probably depend on physical alterations of muscle fiber, and the more conspicuous and rapidly disappearing phase that closely follows a tetanus may depend on chemical substances liberated by the tetanus.

SUMMARY

The interpolation of a stretching in a series of maximal muscular contractions of gastrocnemius in the guinea-pig leads to a potentiation of subsequent twitches of the same order as the one obtained by a short tetanus. This phase would be of physical nature as contrasted with the more conspicuous and more evanescent one after a tetanus that might be of chemical nature.

RESUMO

POTENCIAÇÃO APÓS ESTIRAMENTO, DOS ABALOS MUSCULARES EM MAMÍFERO

Na potenciação post-tetânica dos abalos musculares do gastrocnémio da cobaia são distinguidas duas fases: uma logo após o tétano, mais intensa e de curta duração e de natureza muito provavelmente química; outra contínua, podendo durar vários minutos, de natureza possivelmente física.

BIBLIOGRAPHY

- BROWN, G. L. & VON EULER, V. S., 1938, The effects of a tetanus on mammalian muscle. *J. Physiol.*, 93: 39-60.
- GUTTMAN, S. A., HORTON, R. G. & WILBER, D. T., 1937, Enhancement of muscle contraction after tetanus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 34:219-221.
- GUTTMAN, S. A., HORTON, R. G. & WILBER, D. T., 1937, Enhancement of muscle contraction after tetanus. *Amer. J. Physiol.*, 119: 463-473.
- ROSENBLUETH, A. & MORISON, R. S., 1937, Curarization, fatigue and Wedensky inhibition. *Amer. J. Physiol.*, 119: 236-256.

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DE “POLYBIA FURNARIA” IHERING, 1904 (Hymenoptera, Vespidae)¹

R. L. ARAUJO

Instituto Biológico, São Paulo

(Com 3 figuras no texto)

Polybia furnaria Ihering, 1904

IHERING, R., 1904, *Rev. Mus. Paul.*, 6:217, 274, est. 8, f. 13 (ninho);
DUCKE, A., 1905, *Bol. Mus. Goeldi*, 4 (4) : 679; idem, 1907, loc. cit.,
5:173; idem, 1910, *Ann. Mus. Nat. Hung.*, 8:514 (fig. 10, ninho), 515;
FONSECA, J. P., 1926, *Rev. Mus. Paul.*, 14:172.

Fêmea (Fig. 1) — Cabeça, vista de cima, mais larga que o tórax na altura dos ângulos umerais; vista de frente, pouco mais larga que alta; margem occipital fortemente encurvada. Occipício separado das genas e do vértice por carena nítida, porém pouco elevada e que se extingue na dilatação máxima das genas. Genas ligeiramente mais estreitas que os olhos, vistos de perfil, pouco abauladas; estreitadas nos terços inferior e superior, naquele em linha reta e neste em curva, não formando ângulo saliente. Espaço óculo-malar estreitíssimo, alargado em direção à gena. Olhos mais distantes no vértice que ao nível do clipeo. Ocelos em triângulo ligeiramente alongado (3:2, situados em depressões rasas; cómoros ocelares muito pouco salientes; ocelos posteriores afastados da margem dos olhos na seguinte proporção: L00:L0P:9:2. Fronte abaulada, ligeiramente sulcada ao longo da fina sutura que vai do ocelo anterior ao escudo interantenal o qual é conspicuamente elevado; zonas laterais mui ligeiramente abauladas e em declive junto às inserções das antenas; suturas sub-antenas muito curtas e semi-ocultas pela vilosidade. Clipeo, excluídas as expansões laterais, 1/5 mais largo que alto; contíguo aos olhos desde o terço superior de sua altura até às expansões laterais; margem superior em curva muito pouco pronunciada; lados em linha reta da fosseta subantenal aos olhos; ápice truncado e correspondente a 1/5 do lado inferior, excluídas as expansões laterais. Mandíbulas de lados paralelos, o inferior ligeiramente côncavo na metade basal; dos quatro dentes o superior é pequeno, rombo,

¹ Recebido para publicação a 19 de fevereiro de 1946.

e os demais afilados, gradativamente aumentados de tamanho e mais recurvos; três dentes secundários, internos, voltados para cima e colocados abaixo da base, intercalados com os dentes primários. Antenas normais; escapo fracamente encurvado, pouco engrossado para a extremidade; pedicelo da metade do comprimento do III segmento, constricto na base, pouco dilatado; III equivalente em comprimento aos IV e V; estes iguais; VI a XI de comprimentos iguais e larguras crescentes; XII afilado para a extremidade, de ponta arredondada, igual em comprimento a metade do III e em sua largura basal pouco inferior ao XI.



Fig. 1 — . *Polybia furnaria* Ihering, fêmea.

Tórax, visto de perfil, um terço mais longo que alto; carena pronotal anterior superiormente bastante saliente e ao centro claramente escavada; acima do ângulo ântero-ventral uma proeminência cortante, inconspícua, terminada sobre a fosseta pronotal a qual é também inconspícua; carena pronotal ("Crista") curta, porem bastante saliente, cortante e ligeiramente voltada para trás; ângulos umerais não salientes; todo o pronoto bastante desenvolvido, aparentemente truncado na frente; margem posterior ao centro em curva larga e com os lados mui pouco sinuosos. Mesonoto ligeiramente mais largo

que longo; uniformemente abaulado, pouco saliente. Bolsa escutelar bastante profunda, com fundo liso. Escutelo fraco mas regularmente abaulado; pouco inclinado com relação ao mesonoto. Depressões metanotais rasas, porem com uma zona circular bastante profunda junto ao postescutelo. Postescutelo bastante abrupto, praticamente plano, apenas os lados fracamente encurvados; margem anterior sinuada. Propódeo bastante abrupto; larga e profundamente sulcado ao centro; ao fundo e na zona inferior do sulco mediano uma finíssima estriação transversal; lados arredondados, pouco salientes e desprovidos de estriação. Mesopleuras fortemente abauladas e salientes, as saliências claramente perceptíveis visto o inseto de cima. Tégulas arredondadas, oblongas, uniformemente convexas. Asas anteriores de 6 a 6 1/2 mm. de comprimento; nervulação do tipo comum em *Polybia*; estígma bem desenvolvido; parastígma alongado; Cub¹ alongada, fortemente estreitada no terço distal; Cub² muito fortemente estreitada em cima; Cub³ quadrangular, apenas alargada distalmente e pouco alongada no ângulo distal inferior. Asas posteriores normais; hamuli em número de 6. Patas normais; o esporão das tíbias anteriores com o "pente" ocupando quase toda a margem.

Pecíolo pouco mais longo que o II segmento abdominal; a dilatação posterior inicia-se já no começo do segundo quarto, vista de perfil a linha superior eleva-se a princípio suavemente, é depois pouco mais abrupta e continua em seguida plana; linha inferior apenas sinuada. Estilete com 6 farpas.

Opaca, exceto mandíbulas, extremidade do clipeo, vértice e parte da frente, mesonoto e escutelos. Frente e vértice esparsa, mas regularmente pontuados; pilosidade clara, hirta, esparsa. Clipeo e zonas laterais da frente cobertas de finíssima pilosidade recumbente, argêntea e brilhante; pontuação do clipeo muito esparsa e mascarada pela pilosidade; um triângulo apical no clipeo destituído de pilosidade, brilhante e provido, assim como toda sua margem livre, de longos pêlos hirtos, amarelos. Olhos, principalmente na zona superior, providos de pilosidade esparsa e curtíssima. Genas com o mesmo revestimento piloso, brilhante, argênteo e pontuação imperceptível. Tórax também recoberto de pilosidade argêntea. Pronoto com pontuação fina, esparsa, regular, pouco mais adensada nos ângulos posteriores. Mesonoto brilhante, com pontuação diminuta, regularmente esparsa e conspícua. Escutelos com a pontuação densa, porem mais rasa e inconspícua que a do mesonoto. Propódeo com puncturas um pouco mais desenvolvidas que as de outras regiões, porem mais esparsas. Abdômen fosco.

Negra a castanho-ferruginosa. Mandíbulas, antenas, patas, nervulação alar, castanho-claras. Cabeça negra, com as seguintes maculações amarelas: maior parte da superfície externa das mandíbulas, maior parte das genas; clipeo, salvo larga mancha castanha central; zonas laterais da frente; duas manchas contíguas sobre o triângulo interantenal; toda a parte central do pronoto, desde o ângulo ântero-ventral até ao bordo posterior; grande parte das mesopleuras; tégulas; margens superiores dos escutelos, largamente; metade infe-

rior do propódeo, salvo o sulco mediano; bordos dos segmentos abdominais I - V; coxas anteriores; manchas nas medianas e posteriores. As tíbias e tarsos são amarelo-acastanhados.

Comprimento (Cabeça + tórax + terg. abd. I e II) 7 mm.

Macho — Não dispusemos de machos no material examinado. Segundo IHERING e DUCKE, este sexo distingue-se por ter a cabeça mais arredondada; olhos maiores e estreitando sensivelmente o clipeo; o abdômen mais alongado; clipeo e lado inferior do tórax inteiramente amarelo-claros; antenas castanho-claras na face inferior.

Ninho (Figs. 2 e 3) — O ninho desta espécie foi descrito e figurado por IHERING já em 1904. DUCKE (1910, p. 514) apresenta melhor ilustração.

Sua construção obedece ao tipo característico do gênero *Polybia*, isto é: fragmocitário perfeito. É preso às árvores por fino galho que lhe atravessa a



Figs. 2 e 3 — *Polybia fumnaria* Ihering, ninhos.

saliência apical superior. Os favos são planos, perfurados circular e excêntricamente. Num dos dois exemplares que examinamos a forma geral é irregularmente prismática, as faces de larguras diversas e algumas das arestas muito pouco salientes; o outro exemplar é de forma ainda mais irregular, alargado em cima e com a face superior em declive, ligeiramente abaulada e um pouco expandida no encontro com as paredes verticais. São os ninhos desta espécie providos de apófises espiniformes colocadas nas margens superior e inferior e que lhes emprestam aspecto característico. Dimensões: Comprimento (excluídas as apófises) 6,5 cm; maior diâmetro 4,5 — 5,5 cm. Alvéolos: Altura 9 mm., diâmetro 3 mm.

O material de construção é argila. Fragmentos do ninho submetidos à calcinação, e destruída a matéria orgânica, deixaram como resíduo uma substância de natureza argilosa, extremamente friável, de cor amarelo-clara. Desse material são constituídos o revestimento externo do ninho, os septos transversais e a base dos alvéolos até ca. 1 mm de altura. As paredes dos alvéolos são construídas com uma substância orgânica, de base celulósica, de mistura com pequena quantidade de impurezas argilosas que aparecem nas paredes alveolares como que estratificadas e intercaladas com a parte orgânica. Agradeço ao meu amigo Dr. C. H. FLORENCE, deste Instituto, as observações sobre a natureza do material de construção do ninho.

Distribuição geográfica — Brasil: Pará (Santarem, seg. IHERING; Amazonas (Tefé, seg. DUCKE). Examinamos material procedente do Amazonas (Yauareté, BOY coll.; Manáos, PARKO coll.)

Polybia furnaria é facilmente reconhecível pelos seguintes caracteres principais: ausência de estriação propodeal; sulco propodeal longo, nítido; ausência de pubescência forte no tórax; pontuação geral fina; asas quase que inteiramente hialinas; clipeo pouco mais largo que alto; corpo em sua maior parte opaco; "crista" protorácica saliente; genas quase da largura dos olhos de perfil; pronoto aos lados bastante desenvolvido e na frente quase truncado; mesonoto conspicuamente brilhante. Ecologicamente *P. furnaria* reune-se a duas outras espécies (*P. singularis* Ducke, 1909 e *P. emaciata* Lucas, 1879) que constroem ninhos de argila. Os ninhos destas espécies distinguem-se também prontamente. O de *P. singularis* é globuloso e provido, no envólucro externo de longa fenda longitudinal que dá acesso a todos os favos os quais "ne sont pas percés, mais ils communiquent d'un côté par des échancrures, qui forment une large galerie latérale" (DUCKE, 1910). O ninho de *P. emaciata* é de forma variável, principalmente globuloso ou alongado, às vezes provido de tubérculos espiniformes; o orifício de entrada é pequeno, circular e comunica com uma galeria formada por fendas laterais dos favos.

O SISTEMA RETÍCULO-ENDOTELIAL NA BLASTOMICOSE BRASILEIRA EXPERIMENTAL DO COBAIO ¹

DEMETRIO PERYASSÚ

Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 24 figuras no texto)

Quando em 1942, externamos nossa opinião sobre o estudo da ação dos derivados sulfamídicos na blastomicose brasileira, emitimos o conceito de que os diversos sulfa-derivados agiam criando uma fase estática do parasito, permitindo deste modo que o organismo entrasse com o seu coeficiente de defesa.

Nessa ocasião, levantamos o conceito da defesa alérgica, como uma reação ativa do organismo, arregimentando um infiltrado agressivo capaz de destruir os efeitos nocivos do parasito e mesmo levar à cura clínica. Essa defesa dissemos, corria a conta do S. R. E., que se fazia representar pelo seu elemento mais importante, o histiocito.

Diante dessa concepção, procuramos um meio de concretizar nosso ponto de vista, motivo porque realizamos as experiências que seguem.

Entretanto, antes de apresentarmos o estudo experimental propriamente dito, queremos discutir uma vez mais os aspectos histofisiológicos encontrados na blastomicose brasileira.

Nesta micose, devemos encarar a um só tempo, não somente as propriedades do parasito, como também os meios de defesa do organismo e as maneiras por que são eles utilizados.

O *Paracoccidioides brasiliensis* Almeida, 1930, é um cogumelo patogênico dotado de elevado poder toxigênico, agindo sobre o indivíduo, não somente pela sua capacidade de resistência às defesas

¹ Recebido para publicação a 16 de abril de 1946.

Trabalho da Cadeira de Clínica Dermatológica e Sifilográfica da Escola de Medicina e Cirurgia (Prof. RAMOS E SILVA).

impostas pelo organismo, mas sobretudo em consequência da ação bloqueante exercida pela exotoxina secretada, que facilita a vitória do parasito sobre o meio.

Procuramos portanto frizar que o *Paracoccidioides* age sobre o ser infectado, não somente com o seu elevado poder patogênico, mas também com a ajuda inestimável conferida pela exotoxina.

Quanto à defesa orgânica, essa depende essencialmente do modo porque se comporta o S. R. E.. Sabemos que na blastomicose brasileira, é ele solicitado e sua resposta não se faz demorar; a maneira dessa reação, em princípio, é função do estado em que se encontra o Sistema de Aschoff, isto é, o grau de defesa orgânica, está na razão direta da excitação conjuntivo-histiocitária.

Este ponto de vista fisio-patológico é assinalado nos diversos quadros encarados nesta micose e são observados frequentemente, sinão vejamos: — Doentes há que, portadores de uma lesão localizada, sem maior repercussão ou comprometimento ganglionar, arrastam-se meses sem porisso dar conta da gravidade de seu mal. Ainda que aparentes, essas lesões, pela sua benignidade insofismável, não preocupam seus portadores e só tardiamente, quando em um surto evolutivo, despertam-lhes a necessidade de uma cura. Casos dessa natureza temos na observação de RAMOS e SILVA. Esse autor relata a história de um barbeiro que apresentava uma lesão única, evoluindo surdamente na parede anterior do abdômen e datando de oito meses. A estrutura tuberculóide franca, veio confirmar desde logo a energia potencial e real de defesa deste paciente que não foi levado de vencida pela ação patogênica de tão violento parasito.

Ao par deste caso excepcional, RAMOS e SILVA, PADILHA GONÇALVES e nós mesmos, temos observado pacientes em que às primeiras manifestações clínicas da doença, soma-se desde logo uma debilidade reacional notada pelo mau estado que apresenta o doente, abalado pela toxemia específica. Em casos dessa natureza, não é com surpresa que vemos o parasito franquear as barreiras linfáticas e invadir gânglios da vizinhança onde novos focos se instalam e a partir dos quais dar-se-á cedo ou tarde a disseminação de "proche en proche" observada nesta micose. Num indivíduo que chegou a tal estado, apresentando defesas protraídas, a difusão hemática faz-se sem maior embaraço, determinando múltiplas localizações cutâneas ou viscerais.

Admitimos que estes estádios clínicos traduzem desde logo, na blastomicose brasileira, a estreita interrelação do parasito com o orga-

nismo. Deste modo, não podemos falar em germes com virulência exaltada, nem em defesa orgânica especial.

Concluimos que na blastomicose brasileira, há na realidade um estado de equilíbrio instável entre o parasito e sua ação patogênica lutando contra um retículo-endotélio estruturando infiltrados reacionais.

Se o organismo entrar em falência, o desequilíbrio torna-se irreversível, porquanto a exotoxina paracoccidiana funciona como bloqueadora do S. R. E.

Si entretanto o conjuntivo-histiocitário consegue desde cedo opor uma resistência eficaz, a blastomicose deixa de ser uma doença geral para se tornar um mal local, si bem transitório, porquanto as defesas imuno-biológicas são apenas alérgicas, necessitando de uma ajuda para concluir o trabalho de cura. Os sulfa-derivados agem inibindo a ação patogênica do *Paracoccidioides*, permitindo a ação integral do sistema retículo- endotelial, segundo nosso ponto de vista anterior.

Justificando deste modo nosso objetivo passaremos ao estudo experimental, objeto deste trabalho.

ESTUDO EXPERIMENTAL

Para levar a bom êxito nossa experiência, ideamos um método estandardizado que nos permitisse uma observação o quanto possível uniforme. Assim procuramos utilizar um único processo de bloqueio ou de exaltação do S. R. E.; para evitar possíveis tropeços, inoculamos sempre num mesmo testículo a emulsão de *Paracoccidioides brasiliensis*, e o material infectante, em cada lote de animais, teve em geral a mesma procedência, isto é, trabalhamos uniformemente com material de cultura ou com pús humano ou animal.

Todas as vezes que utilizamos culturas como material infectante empregamos emulsões turvas, pela alta condensação de cogumelos. Não nos arrependemos desta prática como veremos no estudo de animais com os sistemas de defesa exaltados. No trabalho com pús humano ou animal empregamo-lo diluído ao meio, em sôro fisiológico.

Nossa experiência compreendeu três tipos diferentes de pesquisas a saber: comportamento do S. R. E. em animais bloqueados; comportamento do S. R. E. em animais em estado de exaltação de defesa;

comportamento do S. R. E. em animais abandonados aos seus recursos naturais de defesa. Estudaremos cada tipo de experiência isoladamente.

A BLASTOMICOSE BRASILEIRA EXPERIMENTAL
DO COBAIO COM BLOQUEIO DO S. R. E.

Esta primeira sorte de experiências destinou-se a verificar o comportamento do sistema de Kiyono, quando inibido e em face do *Paracoccidioides brasiliensis*.

Aproveitamos as propriedades bloqueantes dos corantes vitais, utilizando o *Tripan Blau* em suspensão coloidal a 1/1.000, visto ser este produto químico dotado de elevado poder de fixação retículo-endotelial associado a sua baixa toxicidade.

Para efeito de inoculação experimental, consideramos indefesos, os animais que sob a ação do azul Tripan, chegaram à saturação, atestada pela coloração azul do tegumento, denunciada nas visinhanças dos pavilhões auriculares e nas escleróticas.

Para conseguirmos este *desideratum* procedemos com injeções de 2,5 cc. de soluto coloidal em dias alternados, feitas na cavidade abdominal. De um modo geral, a tolerância foi boa, não se verificando morte dos animais por intoxicação.

Conseguimos um bloqueio avançado no prazo de cerca de um mês. Uma vez preparados, os animais apresentavam-se tristonhos e notava-se em todos a queda espontânea dos pêlos. Após a inoculação, o bloqueio foi mantido com a mesma técnica.

Inibidas as defesas gerais do cobaio, procedemos a inoculação experimental com um cc. de suspensão cultural do *Paracoccidioides brasiliensis*, amostra mantida há dois anos em cultivo em meio líquido (amostra W. P. V. da coleção do Dr. Padilha Gonçalves). Esses animais, pesados no início do bloqueio, foram-no outra vez na data da inoculação, e bem assim no decurso do período de observação, tomaram-se várias mensurações ponderais, como se vê no quadro anexo nº 1. As verificações do diagnóstico de *causa mortis*, foram feitas pela autópsia seguida do estudo histopatológico das diferentes visceras. Para simplicidade de nossa exposição futura denominaremos os animais pela letra C, seguida abaixo de seu número na série a que pertencem.

QUADRO N.º 1

CLASSIFICAÇÃO	PESO	SEXO	CAUSA MORTIS	PERIODO DE OBSERVAÇÃO	ZONA DE INOCULAÇÃO	MATERIAL INFECTANTE
C ₁	310 g. 340 g.	M.	Bronco-pneumonia	12 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.
C ₅	860 g. 850 g.	M.	Bronco-pneumonia	20 dias	Testículo esquerdo	Pós testicular do cobaio C ₁
C ₃	480 g. 450 g.	M.	Sacrificado	38 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.
C ₂	590 g. 540 g. 560 g. 600 g.	F.	Sacrificado	177 dias	Cavidade abdominal	Cultura. Amostra W. P. V.
C ₄	480 g. 550 g. 650 g.	M.	Sacrificado	198 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.

Ao estudarmos o presente quadro, verificamos que a curva ponderal não permite tirar grandes conclusões quanto a possível influência do bloqueio sobre o peso dos animais.

As duas primeiras pesagens dizem respeito como já frizamos, uma ao início do bloqueio e a segunda ao momento da inoculação experimental. As demais foram realizadas no decurso da evolução da doença.

Em relação as duas primeiras mensurações, si em alguns animais observou-se queda de peso, nos demais esse fato não foi assinalado, muito ao contrário, houve aumento do mesmo. Nos animais em que foi possível efetuar pesagens no decurso da observação clínica, constatou-se não haver influência da doença sobre a curva ponderal, com exceção do cobaio C₂, onde houve oscilação.

Ainda nesse quadro verifica-se que nos animais não sacrificados, a morte adveiu como consequência de bronco-pneumonia e o diagnóstico nesse caso foi confirmado pelo estudo histopatológico dos pulmões retirados para controle.

Os animais observados mais demoradamente e sacrificados, apresentaram um aspecto anormal dos pulmões que se apresentavam de tom róseo amarelado em segmentos lobulares e consistentes à palpação. No estudo histo-patológico destes cobaios, encontramos correspondendo a essas áreas, processo com infiltrado inflamatório crônico

inespecífico. É evidente que tal achado nos pulmões destes cobaios, sobretudo de C_1 e C_2 , não constitui mero acaso e sim vem demonstrar a pouca resistência pulmonar, atestada com a pneumonia crônica de que eram portadores.

Apesar de termos procurado insistentemente, não encontramos células de *Paracoccidioides* nos campos pulmonares desses diferentes animais.

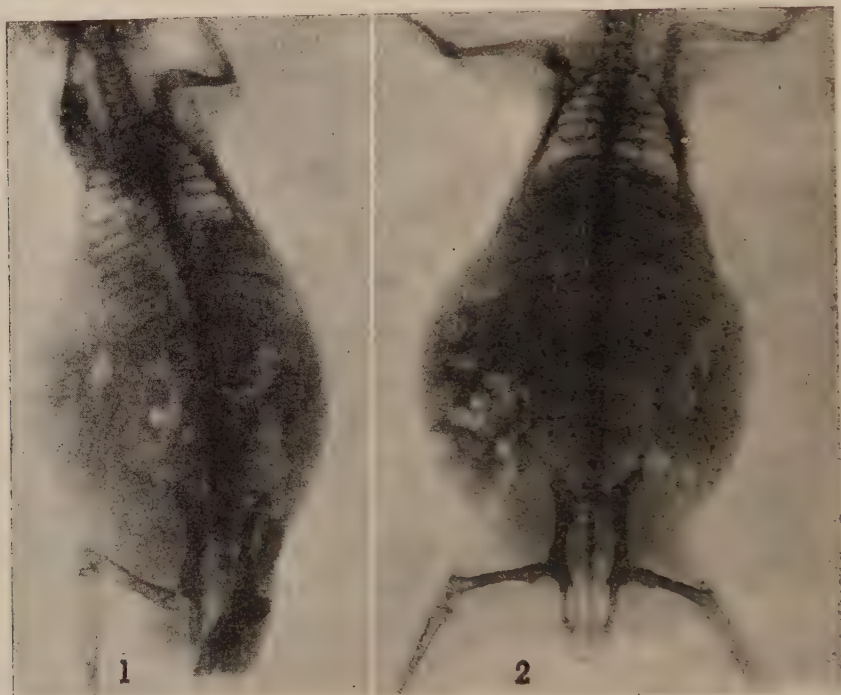


Fig. 1 — Cobaio C_1 ; nota-se ausência de lesões ósseas e discretas manchas de condensação pulmonar.
Fig. 2 — Cobaio fêmea C ; nota-se a presença de sombras pulmonares discretas, ausência de lesões ósseas e o grande volume da cavidade abdominal, sem que sejam verificados sinais radiológicos de gravidez, o volume exagerado sendo consequência do processo blastomicoso que evoluiu na cavidade abdominal.

O fato do achado desses processos crônicos pulmonares nos cobaios C_1 e C_2 , não constituiu de todo surpresa para nós, uma vez que uma radiografia dos mesmos, demonstrou nos territórios pulmonares, áreas sombreadas, si bem discretas, como se pode vêr nas figs. 1 e 2. Essas radiografias serviram também para o estudo do esqueleto que, entretanto, não apresentou alterações dignas de menção.

Durante o período de sobrevida dos animais à inoculação experimental, foram os mesmos submetidos a constante observação, chamando desde logo nossa atenção, o fato da evolução do processo testicular

como se fosse a de uma infecção aguda e supurativa. De fato, esses animais observados a prazos curtos permitiram-nos constatar os seguintes achados:

Dentro dos dez primeiros dias, após a inoculação experimental, o testículo injetado com material infectante, apresentou-se volumoso e edemaciado, sendo esse último pronunciado nos planos peri-

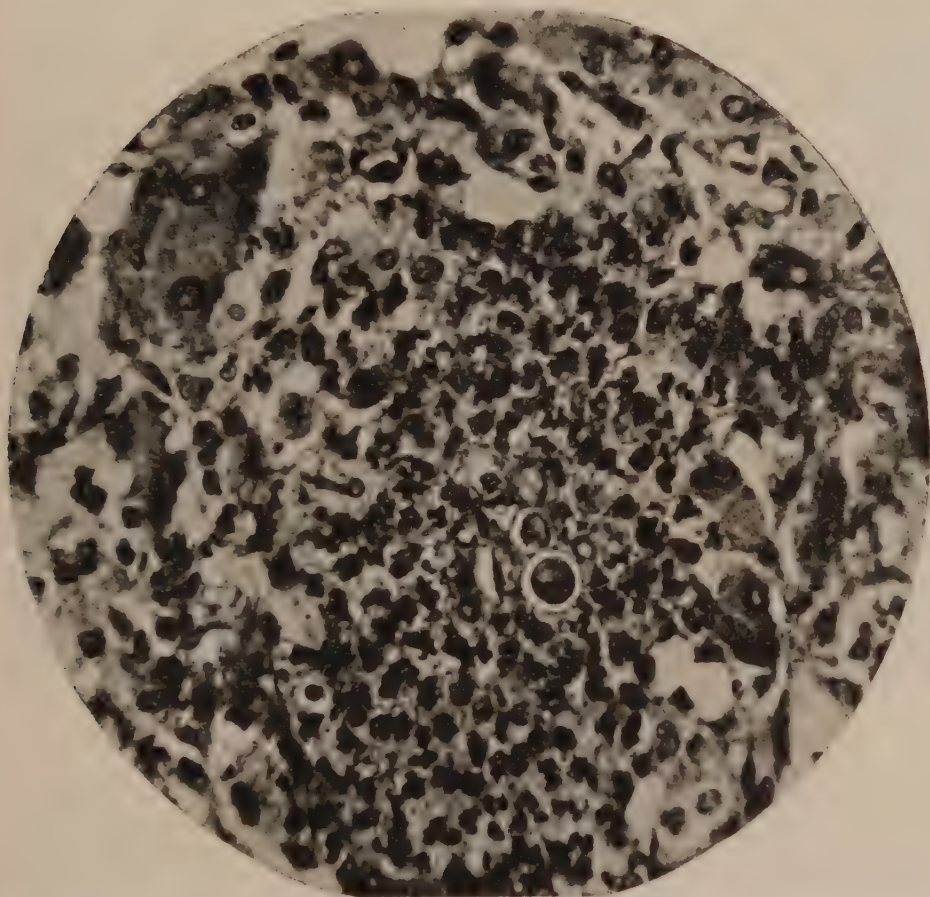


Fig. 3 — Cobaio C₁, testículo, micro-abscesso em formação e centralizado por um conjunto de parasitos, 1000 x.

-vicerais que aderiam intimamente ao órgão nobre. Pele das bolsas escrotaes congestas. À proporção que os dias se passavam, o processo que evoluía rapidamente, caminhava para a flutuação e fistulisação no prazo médio de um mês. Do testículo do cobaio C₁, 32 dias depois de inoculado, retiramos puncionando, meio centímetro cúbico do pús que foi não somente semeado em Sabouraud de prova, como também

preparamos *frotis* a fim de pesquisarmos o cogumelo, encontrando em abundância, não somente inteiro mas sobretudo apenas em vestígios de suas cápsulas de celulose. Ainda com este material, inoculamos mais um cobaio bloqueiado que tomou a denominação de C₅ nesta série.

Para maiores detalhes sobre o estudo referente ao período de observação destes animais, apresentamos o quadro anexo nº 2.

QUADRO N.º 2

CLASSIFICAÇÃO	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
DATA DA INOCULAÇÃO	20-11-43	20-11-43	20-11-43	20-11-43	22-12-45
PERÍODO DE OBSERVAÇÃO	Logo após a inoculação, edema peri-viceral, com testículo volumoso e duro. Esse quadró cedeu rapidamente, permanecendo apenas as manifestações testiculares, que em 22-12 já caminhavam para abcedação franca com flutuação. Entretanto em..... 30-11-43, aparecimento de placa de gangrena que se ulcera e comunica abscesso testicular ao exterior. O testículo nessa ocasião tem tamanho comparável a uma avelã. Em 9-3-44, o testículo esquerdo também se apresenta volumoso. Radiografia em 30-3-44 não revela lesões ósseas, apenas discretos infiltrados pulmonares. Sacrificado em 2-6-44.	Abdômen volumoso, cobaio perdendo 80 g. em oito dias. Esse aspecto acentua-se dando a impressão de gravidez. Animal tristonho. Até a morte do animal em 12-5-44 quando foi sacrificado esse estado permaneceu inalterável. Uma radiografia não acusou lesões ósseas, mostrando apenas discretas sombras pulmonares. (30-3-44).	Edema peri-viceral com testículo duro, volumoso e fixo aos planos visinhos. O edema inicial da bolsa escrotal, cede, deixando o órgão nobre volumoso e fixo aos planos visinhos. Sacrificado, em..... 28-12-43	Edema peri-viceral pronunciado, seguido de lesão similar na bolsa testicular direita. Testículo esquerdo volumoso e fixo. Com o desaparecimento do edema das bolsas escrotais, ficou apenas o testículo esquerdo volumoso e fixo aos planos visinhos. Cobaio morto de broncopneumonia em..... 2-12-43.	Si bem inoculado com material de pús animal, este cobaio não fugiu às lesões encontradas nos demais, isto é, edema periviceral com precocidade no aparecimento do volume exagerado do órgão nobre. Em 2-1-44, já se notava flutuação testicular. Morte do animal em 11-1-44, em consequência de broncopneumonia.
EXAMES DE LABORATÓRIO	Em 30-11-43, pesquisa de <i>Paracoccidioides</i> no pús eliminado pela fistula centralizando a placa de gangrena. Em 22-11-43, pesquisa no pús obtido por punção. Em.... 31-3-44 no pús da fistula testicular. Pesquisas sempre coroadas de êxito.	Não foram feitos dada a impossibilidade na colheita de material.	Em 28-12-43, pesquisa positiva no pús testicular, material colhido após a morte do animal. Presença de <i>Paracoccidioides</i> em grande abundância.	Em 2-12-43, pesquisa no pús recolhido depois da morte do animal. Encontraram-se raros parasitos e ainda restos culturais alterados pela violência da reação.	Não foram realizados

Estudo anátomo-patológico

Cobaio C₁ — Aberto o animal, encontramos: na parede lateral interna, do flanco abdominal esquerdo e fazendo discreto relevo sobre o interior da cavidade, de onde se destacam pela intensa impregnação de azul tripan, nódulos bosselados de pequenas dimensões. Esses elementos eram de consistência pastosa. Hipertrofia ganglionar generalizada, resaltando-se os gânglios tráqueo-brônquicos pelas suas proporções comparáveis às de um grão de arroz.

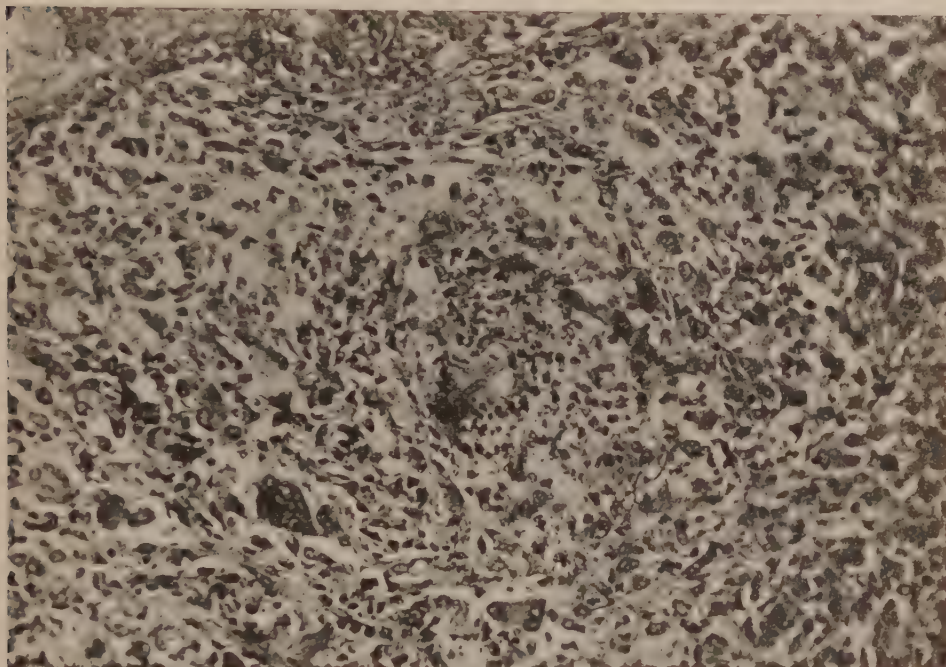


Fig. 4 — *Cobaio C₁*, testículo.

Pulmões de tom róseo amarelado, duros à palpação, sendo esse aspecto observado apenas em certos pontos lobulares: canal torácico volumoso e de dimensões próximas das da aorta, e de aspecto granuloso. Baço volumoso, com cerca de três vezes o seu volume normal e superfície granulosa. Testículo esquerdo, epidídimo e canal ejaculador volumosos, sendo que o testículo assume as proporções de um ovo de pombo. Esse órgão acha-se supurado e fistulizado, notando-se no interior do abscesso e da fistula, pús azulado devido à impregnação pelo azul tripan. Ulceração da bolsa escrotal e localizada acima desta última, cicatriz resultante da placa de gangrena curada durante o período de observação.

Microscopia: a) Pulmões — processo inflamatório crônico em focos, encontrando-se discreta fibrose do parênquima invadido pelo processo inflamatório. Numerosos nódulos linfóides irregularmente disseminados pelo parênquima pulmonar, são vistos em vários pontos.

b) Baço — corpúsculos de Malpighi com vasos centro-corpúsculares de paredes esclerosadas; atrofia da polpa branca. Desorganização da polpa vermelha que apresenta numerosos depósitos de pigmento.

c) Gânglios — hiperplasia ganglionar acompanhada de quantidade apreciável de linfoblastos. Ausência de estruturas inflamatórias e de parasitos.

d) Canal torácico — aumentado nas suas dimensões e túrgido de linfócitos. Em certos pontos, encontram-se focos inflamatórios alguns com células gigantes tipo corpo estranho e células epitelióides. Ausência de parasitos. Si bem não parasitada, essa estrutura histológica mostra-nos como progride a infecção.

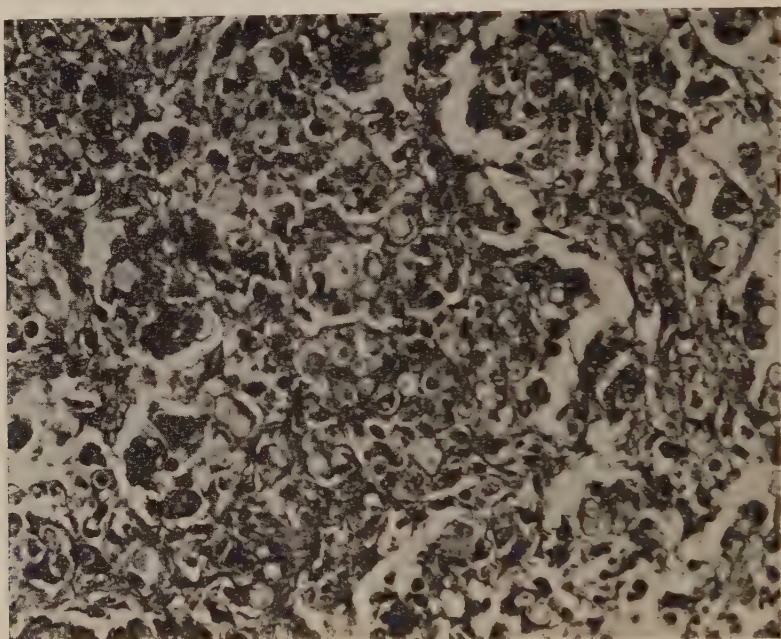


Fig. 5 — Cobaio C₁, testículo. 450 x.

e) Testículo esquerdo — as lesões eram as mais interessantes. Dominando o quadro histológico, encontramos na parte central do órgão, cavidade cheia de piócitos. Nessa ganga em desorganização, assinalam-se numerosas cápsulas de celulose correspondentes a parasitos destruídos. São raros os elementos parasitários íntegros. Limitando a cavidade de abcedação, nota-se fibrose discreta com numerosos focos inflamatórios em que o elemento predominante é o polimorfo-nuclear neutrófilo, si bem sejam encontrados linfócitos. Nesses focos, verdadeiros ninhos de futura micro-abcedação, encontramos parasitos em vários períodos evolutivos (fig. 3). Por vezes, centralizando estas lesões e englobando as células parasitárias, notam-se gigantocitos (fig. 4).

São estas as lesões mais interessantes do quadro histológico deste testículo, levando-se em conta o prazo de 198 dias, tempo de evolução da doença no animal, comprovando dêste modo a eficiência do bloqueio.

Como parede destes micro-abcessos em formação, encontramos exudato inflamatório onde são notados com frequência o polimorfo-nuclear neutrófilo, o linfócito, raros histiócitos, e raríssimas células epitelioides e gigantocitos tipo corpo estranho, sendo que de permeio a esse infiltrado anárquico, são frequentíssimos os parasitos que dominam o conjunto pela sua abundância (fig. 5).

f) Peritoneo — havia sobretudo, uma densa poliferação de células fibro-citárias peritoneais com exudato polimorfo-nuclear neutrófilo e linfocitário discretos. Ausência de parasitos.

Cobaio C₂— Macroscopia: C₂ era uma fêmea e a inoculação experimental foi feita na cavidade peritoneal. Morto este animal, encontramos: Peritoneo espessado, apresentando em sua parede anterior numerosos nódulos bosselados, pediculados uns, sesséis outros de consistência pastosa. Esses elementos se destacavam do resto do peritoneo devido a tonalidade azul intenso. Hiper-

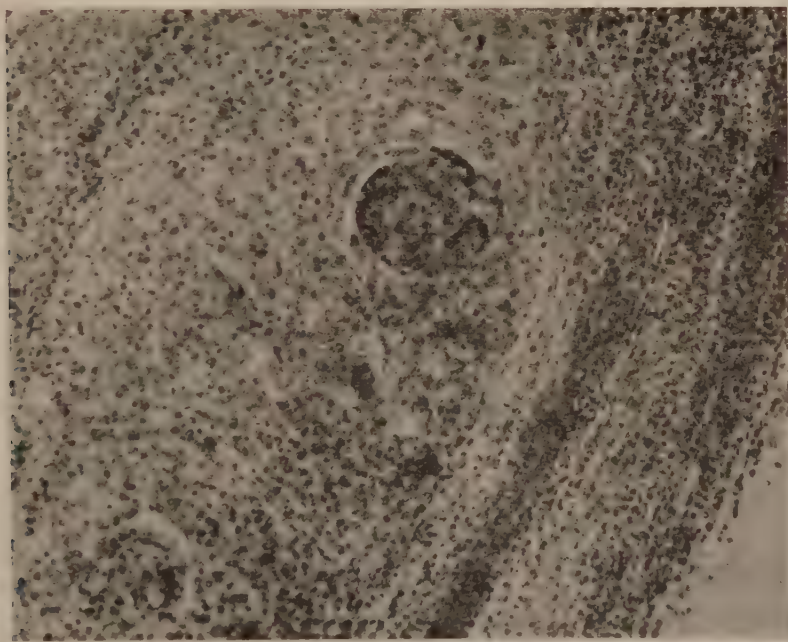


Fig. 6 — Cobaio C₂, peritoneo. 250 x.

trofia ganglionar generalizada, com gânglio tráqueo-brônquico volumoso. Baço aumentado de volume e granuloso. Pulmões com áreas lobulares consistentes e de tonalidade rósea amarelado. Intestino espástico e com numerosos divertículos.

Microscopia: a) Pulmões com grandes áreas, apresentando infiltrado inflamatório inespecífico, discreta fibrose e pontos de hemorragia. Nódulos linfóides eram notados no parênquima pulmonar.

b) Baço com atrofia da pólpa branca. Pólpa vermelha alterada pela insinuação de tecido escleroso que substitue em parte o tecido nobre. Numero-

dos depósitos de pigmento na pólpa vermelha. Ausência de estruturas inflamatórias e de parasitos.

c) Gânglios com hiperplasia, mas sem estruturas inflamatórias e sem parasitos.

d) Lesões peritoneais: Para único aspecto microscópico, encontramos duas estruturas histológicas diferentes segundo sua séde, assim vejamos: — A) A orla limitante dos nódulos apresenta exclusiva condensação de células fibro-citárias com alguns gigantocitos (fig. 6). B) Circunscritos pela estrutura supra descrita, encontramos a parte central dos nódulos caracterizada histologicamente pela reação inflamatória em que de permeio a fibrocitos há denso exudato constituído de raros polimorfo-nucleares neutrófilos e linfócitos, de permeio a abundância de gigantocitos tipo Langhans, contendo uma grande quantidade de parasitos em vários periodos evolutivos e com as dimensões as mais

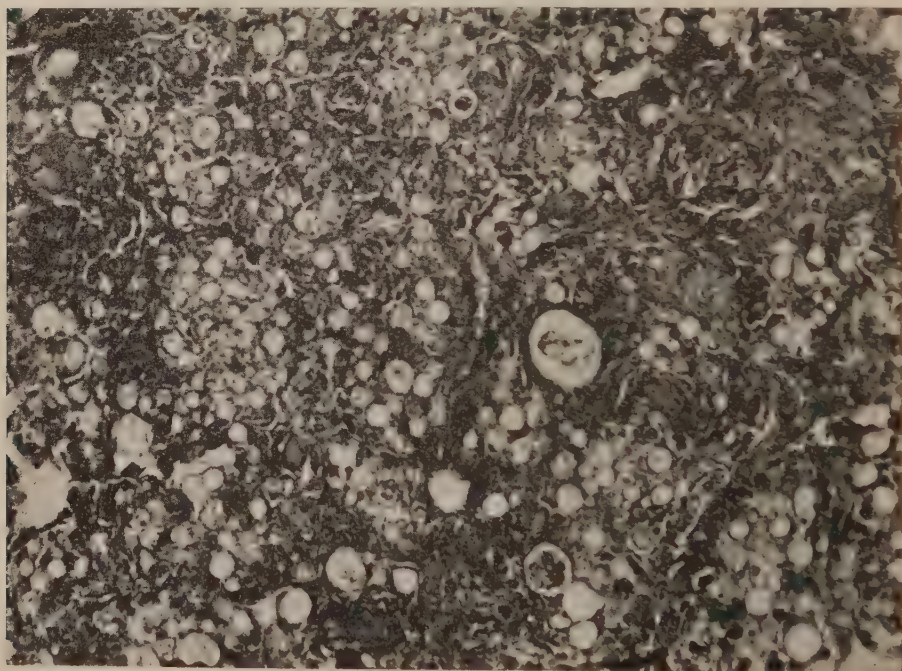


Fig. 7 — Cobaio G_b , testículo, 250 x.

variadas possíveis, registrando-se aí os de maiores proporções por nós encontrados. Ainda que no peritoneo, êste quadro não fugiu em suas linhas gerais ao observado no testículo dos animais do grupo (fig. 7). O que nos chama particular atenção é a falta de focos de supuração, nas lesões peritoneais dêsse cobaio.

Cobaio C_3 — Macroscopia: Ao exame macroscópico, encontramos as seguintes lesões: Pulmões — hepatização em certas áreas, onde se nota tonalidade roseo-amarelado. Baço de volume normal e sem lesões aparentes. Gânglios

mesentéricos e inguinais hipertrófiados. Testículo, epidídimo e canal ejaculador esquerdos, aumentados de volume e aderentes aos planos vizinhos.

Microscopia: a) Pulmões com pneumonia crônica assinalada pelos diversos focos inflamatórios constituídos de infiltrado inespecífico. Ausência de parasitos. Notam-se áreas de hemorragia.

b) Baço com alterações estruturais no sentido da desorganização das formações linfóides esplênicas.

c) Hiperplasia ganglionar sem processo inflamatório e sem parasitos.

d) Testículo com as seguintes lesões importantes pelo seu aspecto: Grandes focos inflamatórios agudos supurados em que predominam o piócito e o

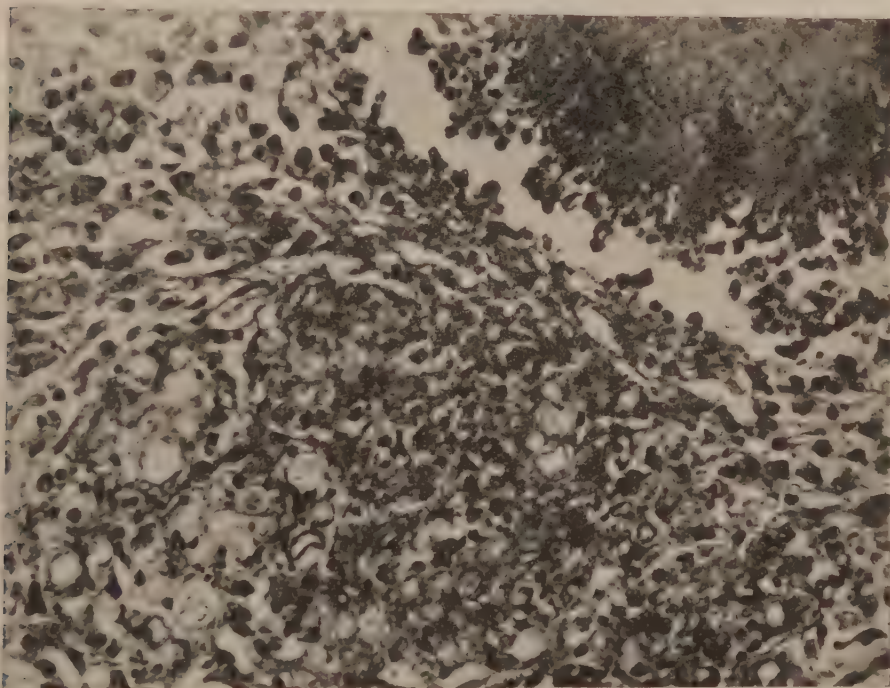


Fig. 8 — Cobaio C₄, testículo. 450 x.

polimorfo-nuclear neutrófilo que constituem verdadeiras corôas em torno de restos culturais alterados. Notam-se raros parasitos integros no meio dessa ganga onde impera a mortificação celular. Circundando esses micro-abscessos, constituem-se em parede, tunicas de fibras colágenas num esboço de esclerose. Nessa parede assim formada, há um denso exudato polimórfico, em que ocupa a primeira plana o neutrófilo seguido do linfócito, além de alguns histiócitos e células gigantes tipo corpo estranho. É portanto um infiltrado predominantemente inflamatório agudo. De permeio a êsses elementos reacionais, assinalam-se parasitos em relativa abundância.

Cobaio C₄ — Macroscopia: Pulmões com hepatisação vermelha. Hipertrófia ganglionar, inguinal e mesentérica. Baço de aspecto normal. Testículo,

epidídimo e canal ejaculador esquerdos, aumentados de volume, sendo que o primeiro apresenta-se inteiramente supurado e aderente aos planos visinhos.

Microscopia — a) Pulmões: denso infiltrado inflamatório agudo, ao lado de grandes áreas hemorrágicas. b) Baço com estrutura normal. c) Hiperplasia ganglionar discreta. d) Testículo esquerdo: Este órgão foi sede de profundas lesões que culminaram na substituição do tecido nobre, isto é, dos tubos



Fig. 9 — Cobaio C₅, testículo. 100 x.

seminíferos, numa vasta cavidade contendo piócitos, restos culturais alterados e raras cápsulas de parasitos. Limitando essa cavidade, encontramos discreta reação colágena onde há polimórfio-nucleares neutrófilos e linfócitos. De mistura a esse infiltrado inflamatório agudo constitutivo da parede do abscesso testicular, assinalam-se em certos pontos, numerosíssimos parasitos (fig. 8).

Cobaio C₅ — Macroscopia: À autopsia encontramos pulmões com hepatisação vermelha; hipertrofia ganglionar inguinal esquerda; baço de aparência normal; testículo esquerdo e epidídimo correspondente volumosos, achando-se o testículo esquerdo totalmente supurado.

Microscopia — a) Pulmões com denso infiltrado inflamatório agudo, além de várias zonas hemorrágicas.

b) Baço com estrutura normal, si bém com numerosos depósitos de pigmento.

c) Hiperplasia ganglionar sem processo inflamatório e sem parasitos.

d) Testículo: Neste órgão encontramos a estrutura mais aberrante tal como segue:

I) Testículo transformado em vasto abscesso cujas paredes se resumem na teca limitante do órgão, que se apresenta espessada (fig. 9). Nesta micro-fotografia, de permeio ao exudato purulento abundante, vêm-se falhas que correspondem a aglomerados de parasitos, alguns integros ao lado de uma grande maioria resumida a suas capsulas de celulose.

II) Na parede do abscesso, constituída pela teca limitante do testículo, assinalam-se numerosíssimos parasitos em vários estádios evolutivos, cercados de um esboço reacional constituído na sua maioria de polimorfo-nucleares neutrófilos. Esse foi o testículo em que encontramos as lesões mais típicas de ausência total de reação de defesa (fig. 10).



Fig. 10 — Cobaio C_4 , testículo. 450 x.

Do estudo em conjunto dos diversos animais, depreendemos não sem satisfação, um achado histológico que condiz às previsões clínicas.

Realmente, quando analisamos os cortes histológicos dos testículos dos animais C_2 , morto com 12 dias de observação, C_3 , morto com 20 dias de infectado, C_4 , sacrificado com 38 dias de experiência e C_1 , sacrificado depois de 198 dias de estudo, constata-se em linhas gerais um mesmo aspecto, apesar da diferença nos vários períodos a que foram esses animais submetidos a observação.

Nos testículos desses diversos cobaios, predominaram as seguintes lesões:

a) Abcedação franca do testículo, com substituição do tecido nobre (tubuli semini e tecido intersticial) em grande cavidade contendo piócitos e polimorfo-nucleares neutrófilos. No cobaio C_4 , morto com apenas 12 dias de inoculado, no exudato purulento desse abscesso, encontramos ainda restos culturais si bem profundamente alterados, ao lado de raras cápsulas de celulose resultantes da destruição de parasitos já desenvolvidos na lesão. Nos animais com período maior de observação, aparecem com maior frequência, parasitos íntegros no meio de um exudato analogo ao anteriormente acentuado (figs. 8 e 9).

b) As lesões localizadas na parede limitante desse abscesso sofrem modificação à medida que aumenta o prazo de observação dos animais experimentados, sem entretanto fugir do aspecto geral do quadro histológico dominante; assim vejamos:-

I) Parede com quantidade discreta de fibras colágenas, esboçando ligeira fibrose. Entremeando esses elementos colágenos, assinalam-se numerosos polimorfo-nucleares neutrófilos, fibrócitos e linfócitos, estes em menor número, bem como algumas células gigantes tipo corpo estranho, sem que entretanto guardem qualquer organização estrutural. De permeio a êste exudato, encontramos parasitos em número bem apreciavel (figs. 8 e 10).

II) Nos animais observados em grandes períodos experimentais, como ocorreu com o cobaio C_1 fomos encontrar uma hiperplasia reacional que ganhou terreno em prejuizo da cavidade de abcedação. Nesta parede assim constituida, já se assinalam verdadeiras traves fibrosas que percorrem irregularmente a espessura da parede. Nesta, em certos pontos, encontra-se uma quantidade elevada de *Paracoccidioides* em diversos períodos evolutivos, de mistura a um exudato constituído essencialmente de polimorfo-nucleares neutrófilos e linfócitos e em menor quantidade, histiócitos, algumas células epitelióides e gigantocitos tipo corpo estranho, estes últimos representando o esforço supremo do organismo animal para se opor à doença num individuo vencido pelo bloqueio (fig. 5).

Ao lado dessa anarquia estrutural, assinalamos micro-abscessos constituídos na quase totalidade de neutrófilos acompanhados de piócitos na sua localização mais central, ponto onde são vistos parasitos livres ou no interior de gigantocitos (figs. 3 e 4).

Do cobaio C_2 ocupar-nos-emos em separado, dada a natureza da séde onde foi inoculado o material infectante. Neste animal, a infecção foi feita propositadamente na cavidade peritoneal, por se tratar de uma fêmea.

Depois de 177 dias de observação, sacrificado, encontramos na parede anterior do abdômen, localizados no peritoneo, face visceral, nódulos bosselados, pediculados uns e sésseis outros e com a seguinte estrutura: na parte central das lesões, estrutura de fibrócitos e gigantocitos, quantidade apreciavel de *Para-*

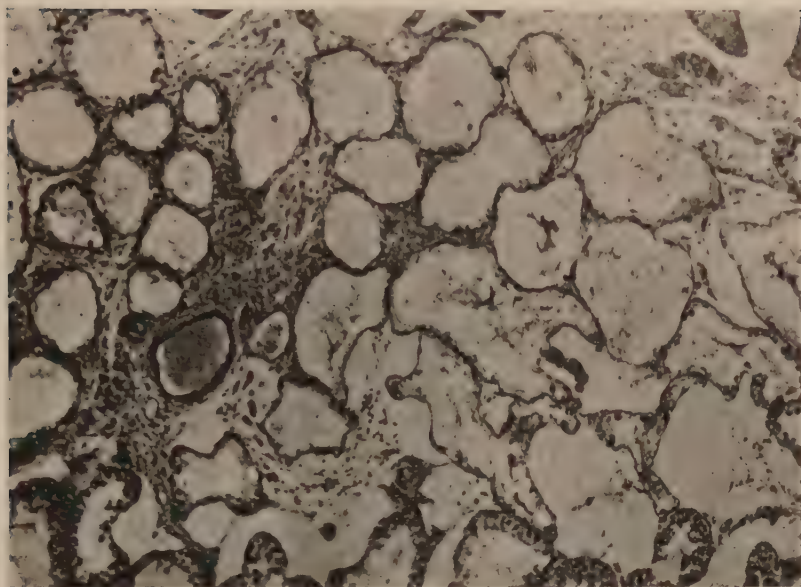


Fig. 11 — Cobaio C₂₀, testículo. As lesões acham-se localizadas apenas no estroma intersticial, cujas células, segundo Kiyono, pertencem ao S.R.E. (células de Kiyono). 100 x.

coccidioides; circunscrevendo esse amago lesional, organiza-se uma parede constituída de denso infiltrado fibrocitário, onde são assinalados raríssimos parasitos.

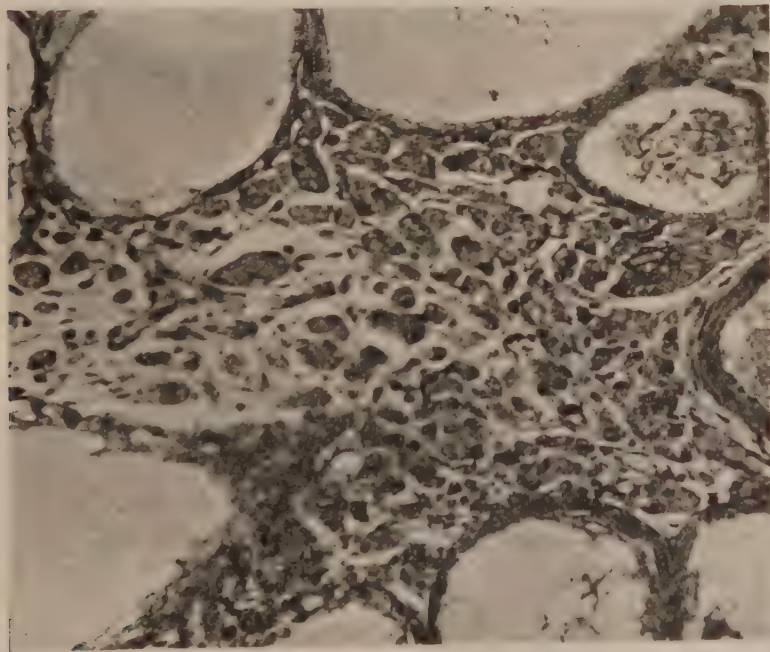


Fig. 12 — Cobaio C₂₀, testículo. Detalhe da fig. 11. Observa-se o aspecto espumoso dos histiócitos, alguns dos quais apresentam vestígios de cápsulas de parasitos. Existem alguns histiócitos com 2 núcleos, mostrando a origem do gigantocito. 450 x.

Pela análise feita, depreendemos que domina neste lote de animais a estrutura inflamatória aguda, conseguindo-se como resultado desse tipo de experiência, a demonstração de que, em animais com o S. R. E. bloqueado, portanto sem defesa, o *Paracoccidioides* vence facilmente as barreiras fisiológicas de reação, insuficientes em função do bloqueio. As reações esboçadas são do tipo dos processos inflama-

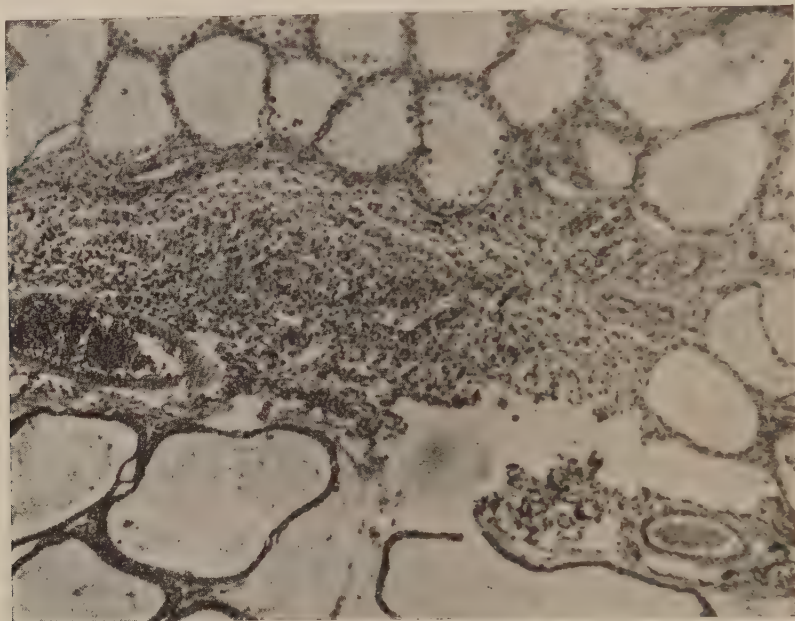


Fig. 13 — Cobaio C₁₄, condensação epitelióide na serosa limitante do testículo e do epidídimo; êste encontra-se sensivelmente atrofiado, aquele acha-se reduzido à sua túnica proliferans. 450 x.

tórios agudos inespecíficos. Estes quadros anatomo-patológicos expressam uma verdadeira anergia histológica.

A BLASTOMICOSE BRASILEIRA EXPERIMENTAL DO COBAIO, APRESENTANDO EXALTAÇÃO DO S. R. E.

Diante dos resultados experimentais obtidos no primeiro lote de animais, objetivamos uma segunda sorte de pesquisas com a finalidade de indagar do comportamento do organismo infectado quando em face da exaltação retículo-endotelial.

Os mesmos agentes que serviram para determinar o bloqueio são aproveitados na exaltação. Varia naturalmente a questão da dose empregada.

Vimos que no bloqueio, ministrávamos em dias alternados 2,5 cc. de soluto coloidal a 1:1000 de azul tripan. Neste grupo experimental, utilizamos ainda o *tripan blau*, dentro da mesma concentração e com

a mesma dose, mas uma vez em 15 dias, e mantivemos o estado de exaltação empregando 2,5 cc. do soluto coloidal uma vez por mês, desde que os animais foram infectados.

Como séde da inoculação, procedemos a ensaios no testículo esquerdo, empregando-se para infectar os animais, suspensões culturais turvas pela sua concentração. O *Paracoccidioides* utilizado proveiu de amostras fornecidas pelo Dr. PADILHA GONÇALVES (amostra W. P. V.) e pelo Prof. RUY GOMES DE MORAIS (amostra R. G. M.).

Os animais pesados no início da exaltação reticulocitária, foram-no durante o período de observação e no momento da inoculação.

Os cobaios deste grupo estão distribuídos, como se pode observar no quadro nº 3.

QUADRO N.º 3

CLASSIFICAÇÃO	PESO	SEXO	CAUSA MORTIS	PERIODO DE OBSERVAÇÃO	ZONA DE INOCULAÇÃO	MATERIAL INFECTANTE
C ₁₁	410 g.	M.	Peritonite	10 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra R. G. M.
C ₁₃	860 g. 780 g.	M.	Bronco-pneumonia	17 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.
C ₁₀	515 g.	M.	Bronco-pneumonia	24 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.
C ₁₂	850 g. 740 g. 850 g.	M.	Sacrificado	75 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra R. G. M.
C ₁₄	830 g. 800 g. 830 g. 820 g.	M.	Sacrificado	201 dias	Testículo esquerdo	Cultura. Amostra W. P. V.

Neste quadro vemos desde início que no processo de exaltação, ainda que paradoxal, todos os animais perderam pêso, embora recuperassem-no durante o período posterior.

A não ser o cobaio C₁₁, morto de peritonite aguda em consequência de um defeito de técnica, e com ele mais duas fêmeas que não constam da presente relação, uma vez não apresentarem lesões específicas, os cobaios C₁₀ e C₁₃, morreram de pneumonia, ainda que protegidos pela excitação retículo-histiocitária, como ficou provado pela anátomo-patologia. Os demais foram sacrificados.

O tempo de estudo destes animais variou de 10 a 201 dias, tendo sido utilizado exclusivamente na infecção dos mesmos, material cultural em suspensões turvas e na dose individual de 1cc.

Passaremos a vêr em detalhe o período de observação de cada um, no quadro seguinte, nº 4.

QUADRO N.º 4

CLASSIFICAÇÃO	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄
DATA DA INOCULAÇÃO	7-7-44	7-7-44	25-10-44	25-10-44	25-10-44
OBSERVAÇÕES	Verificou-se apenas atrofia testicular. Morte em 31-7-44.	Animal morto em... 17-7-44. Não se verificou processo inflamatório agudo testicular.	Observou-se atrofia testicular e aumento do epididimo. Essas lesões mantiveram-se até ao sacrifício em 7-1-45.	Atrofia testicular perdurando até a morte do animal em 12-11-45.	Atrofia testicular progressiva com aumento discreto do epididimo. Antes da morte do animal em 15-5-45 pelo sacrifício o testículo retomou suas dimensões normais.

Chama-nos particular atenção neste lote de animais o fato da ausência de lesões agudas e sim a atrofia testicular seguida de um mutismo reacional. A atrofia testicular manteve-se na quase totalidade dos animais, com exceção do cobaio C₁₂, em que houve aumento do volume do órgão, parecendo haver regeneração. Esse fato entretanto foi apenas aparente como veremos no estudo anatomopatológico. Nos demais, em que a atrofia permaneceu irreparável, o órgão mostrou-se à palpação, amolecido e diminuído de volume. Ao passo que estas lesões se instalam no testículo, no epididimo verifica-se aumento volumétrico discreto, mais evidenciado em virtude da atrofia manifesta do órgão vizinho.

Estudo anátomo-patológico

Cobaio C₁₀ — Estudo macroscópico: Neste animal foram encontrados sinais de hepatização vermelha pulmonar. Testículo esquerdo diminuído de volume em relação ao órgão direito. Epididimo acompanhado de tecido de aspecto mucilaginoso, de tom pardo escuro. Gânglios inguinais volumosos. Baço de aparência normal.

Histopatologia: a) Pulmões com infiltrado inflamatório agudo invadindo várias zonas lobulares.

b) Gânglios e baço de aspecto normal.

c) Testículo: Atrofia testicular global tanto nas zonas traumatizadas pela agulha que injetou a suspensão cultural, como á distancia (fig. 11). É provável corra a atrofia a conta do trauma, uma vez ser êste um órgão delicado estrutural e funcionalmente.

No estroma intersticial e *somente neste*, assinalamos ilhotas reacionais constituídas na sua totalidade de histiócitos volumosos, possuidores de protoplasma vacuolado, contendo algumas dessas cavidades, restos parasitários atestados apenas pelos vestígios de suas cápsulas vasias (figs. 11 e 12).

No tecido de sustentação do epididimo, encontramos rica vascularização de neo-formação, banhando estrutura analoga à precedente. Neste infiltrado encontramos cápsulas típicas de parasitos pre-existentes.



Fig. 14 — Cobaio C₁₄, densa esclerose; vestigio de tubos seminíferos; compacta estrutura tuberculóide. 250 x.

Não tivemos oportunidade de encontrar parasitos íntegros nos vários cortes destes órgãos.

Cobaio C₁₁ — Exame macroscópico: Pulmões de aparência normal. Peritoneo espessado e hiperemiado, apresentando pontos de supuração. Sinais de peritonite. Colheita de material para exames de rotina. Gânglios inguinais congestos, apresentando edema e intensa vascularização peri-ganglionar. Testículo atrofiado.

Exame histológico: a) Pulmões: Estrutura normal.

b) Peritoneo: infiltrado inflamatório agudo supurativo e grande número de vasos de neo-formação.

c) Gânglios com hiperplasia linfóide, apresentando na região peri-viceral atmosfera de tecido conjuntivo frouxo rico em vasos de neo-formação.

d) Testículo esquerdo: atrofia dos tubos seminíferos que se acham resumidos às suas delicadas túnicas de revestimento. Ausência de lesões no tecido

intersticial testicular. Vaginal com apreciável quantidade de vasos de neo-formação e reação fibrocito-histiocitária discreta. Não foram encontrados parasitos ou seus vestígios.

Cobaio C₁₂ — Exame macroscópico: Na autopsia deste animal não foram encontradas lesões dignas de menção, a não ser discreta diminuição do volume do testículo esquerdo.

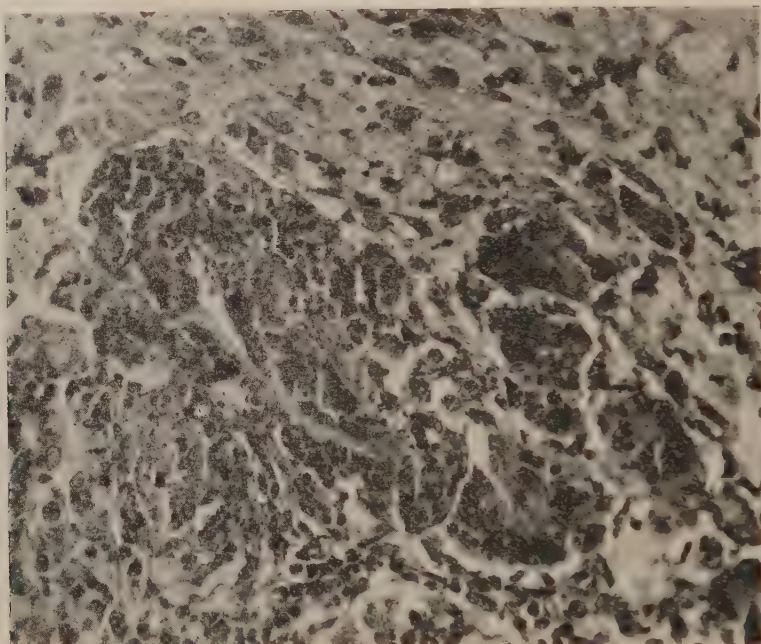


Fig. 15 — *Cobaio C₁₄*, detalhe da fig. 14. 600 x.

Exame microscópico — As vísceras examinadas não apresentaram lesões histológicas.

Testículo esquerdo com estrutura normal. Epidídimo apresentando processo inflamatório crônico em que predominaram as células epitelióides. Não foram encontrados parasitos ou suas cápsulas. Vaginal com numerosos vasos de neo-formação e discreta reação fibrocito-histiocitária.

Cobaio C₁₃ — Exame macroscópico: Pulmões com hepatisação vermelha. Testículo amolecido e com ponto amarelado e supurado nas visinhanças do epidídimo. Placa de necrose da bolsa escrotal na zona de penetração da agulha para inoculação experimental.

Exame microscópico — Pulmões com denso infiltrado inflamatório agudo. Testículo e epidídimo com necrose maciça. Placa de mortificação da bolsa escrotal. Não foram encontrados infiltrados reacionais específicos. Ausência de parasitos. Interpretamos o presente quadro admitindo tratar-se de conta-

minação secundária do testículo, causa da necrose e mortificação tissular. Teria sido então a necrose testicular e não a pneumonia a causa primária da morte? Este animal consta da presente relação como testemunho histológico.

Cobaio C₁₄ — Este animal foi o que apresentou histologicamente as lesões mais interessantes do grupo em estudo.

Exame macroscópico — Cobaio gôrdo e bem desenvolvido. Pulmões de aparência normal. Baço de aspecto normal. Gânglios ligeiramente hipertrofiados. Testículo e epidídimo esquerdos de volume e aspecto normais, si bem mais escuros que os órgãos direitos.



Fig. 16 — Cobaio C₂₁ gânglio, apresentando invasão de parasitos. 250 x.

Exame microscópico — a) Pulmões normais.

b) Gânglios e baço de estrutura normal.

c) Testículo esquerdo e epidídimo: O testículo apresenta atrofia dos tubuli seminí, que se acham reduzidos às suas tûnicas proliíteras, notando-se apenas raros espermatozóides (fig. 13).

Na parte central do órgão encontramos denso infiltrado granulomatoso crônico, percorrido de grandes naves fibrosas (fig. 14). O infiltrado granulomatoso é constituído de grande número de linfócitos, histiócitos, fibrócitos, células epitelióides e gigantes tipo corpo estranho, organisando-se este infiltrado numa bela estrutura tuberculóide (figs. 14 e 15). Nestes cortes, apesar de reiteradas pesquisas, não encontramos parasitos ou suas cápsulas. É digno de menção o fato da grande quantidade de capilares de neo formação e grossos vasos que percorrem o infiltrado. Na intimidade desse infiltrado foram encontradas numerosas cavidades resultantes da atrofia completa dos tubos seminí-

feros. Isso vale dizer que o processo teve origem e como única séde o tecido intersticial.

No tecido conjuntivo frouxo que limita o testículo do epidídimo, foi encontrado um infiltrado de células epitelióides, histiócitos e fibrócitos sem qualquer vestígio de parasito. Acentuada atrofia epididimária (fig. 13).

Neste grupo de animais apresentando S. R. E. exaltado, tivemos oportunidade de verificar os aspectos seguintes:

I) Em alguns animais não encontramos lesões específicas, a não ser atrofia testicular sediada nos tubos seminais, acompanhada de vasos de neoformação

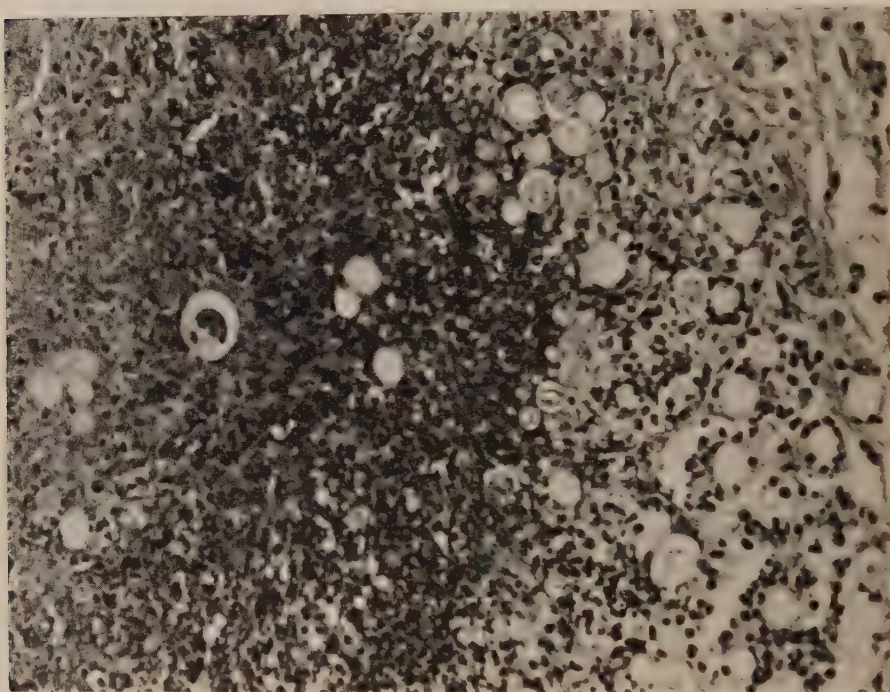


Fig. 17 — Cobaio C₂₁, testículo. 450 x.

e de discreto infiltrado fibrocyto-histiocitário localizados na túnica serosa vaginal.

II) Em animais onde se desenvolveram lesões testiculares, estas foram assinaladas no tecido intersticial e assumiram um aspecto diverso segundo o tempo de evolução do infiltrado; assim, no cobaio C₁₀, observado durante 24 dias, fomos encontrar reação histiocitária exclusiva, assinalando-se no interior de alguns destes histiócitos, vestígios de cápsulas de parasitos.

No cobaio C₁₄, observado 201 dias, as lesões testiculares ostentavam aspecto granulomatoso, organizando-se os elementos reacionais em estrutura tuberculóide franca; neste animal não foram encontrados parasitos em suas lesões.

É digno de nota a reação da vaginal, vista nos animais deste grupo.

Os animais deste grupo foram inoculados com material de cultura de duas proveniências, a saber: cobaios C_{11} e C_{12} inoculados com amostra R. G. M. mantida em cultura em meio sólido (Sabouraud), durante 10 anos e cobaios C_{10} , C_{13} e C_{14} inoculados com amostra W. P. V. cultivada durante 4 anos, em caldo glicosado.

Nos cobaios C_{11} e C_{12} , as lesões encontradas resumiram-se a infiltrados localizados na túnica serosa e de aspecto inespecífico, indicando a ausência de ação patogênica do material infectante.

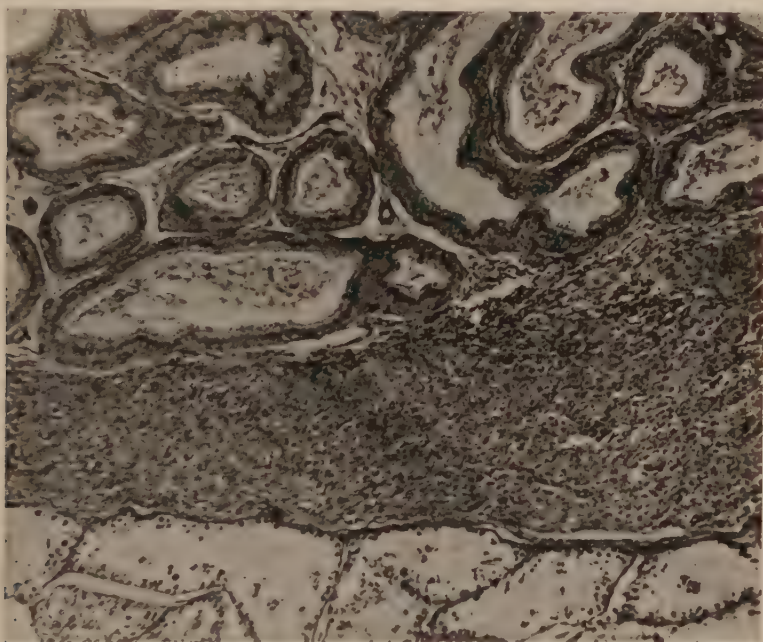


Fig. 18 — Cobaio C_{27} , testículo. 450 x.

Nos animais inoculados com amostra W. P. V., encontramos estruturas reacionais que variaram de aspecto segundo o tempo de evolução da doença experimental, mas consistiram sempre em arquiteturas histológicas denunciadoras de grandes reações.

Diante deste fato, permiti-mo-nos concluir que a manutenção prolongada do *Paracoccidioides* em cultivo, atenua ou abole sua propriedade toxigênica.

Depreendemos do estudo crítico desses animais que a excitação retículo-endotelial não permite o desenvolvimento da blastomicose brasileira experimental sob a forma aguda, reagindo o sistema de Aschoff com uma violência desusada, promovendo a destruição do fungo.

Vale dizer portanto, que o sistema retículo endotelial exaltado, protege os animais contra o *Paracoccidioides* oriundo de culturas, desenvolvendo ao mesmo tempo estruturas histológicas hiperérgicas.

BLASTOMICOSE BRASILEIRA EXPERIMENTAL DO COBAIO, EM ANIMAIS SEM TRATAMENTO ESPECIAL PARA O S. R. E.

Este terceiro tipo de experiência destinou-se a verificar o comportamento do Sistema de Aschoff em animais abandonados às suas próprias defesas. Isto importa em dizer que tais animais não sofreram qualquer tratamento preparatório visando o S. R. E.

Evidentemente este grupo experimental teve em mira estabelecer não somente um *controle de pesquisa* como também completar as já iniciadas sobre a maneira de reação de tão importante setor de defesa, no combate à blastomicose brasileira do cobaio.

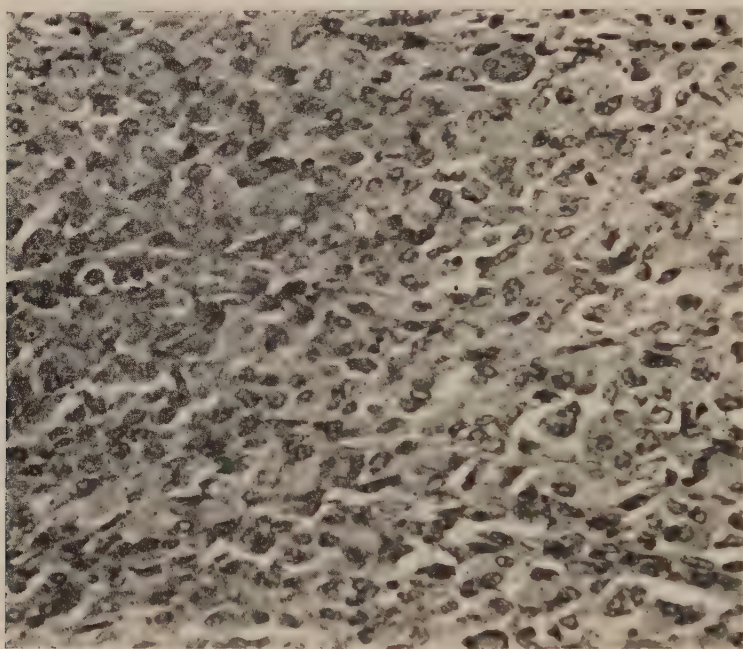


Fig. 19 — Cobaio C₂, detalhe do infiltrado observado na fig. 18, 1000 x.

Os animais para tal fim destinados, foram infectados e submetidos exclusivamente à observação sistemática, para colheita de dados informativos quanto à evolução da doença experimental.

Não deixamos de tomar as mesmas precauções referentes às determinações ponderais dos cobaios no ato da inoculação e, quando pelo praso de evolução da doença, outras pesagens foram feitas.

Para com este grupo de animais, o material infectante foi o mesmo, isto é, trabalhamos inicialmente com material cultural. Diante das respostas fracas desses cobaios ao material de cultura, intro-

duzimos uma modificação na técnica, mantida com respeito até o presente, e passamos a infectá-los com material de proveniência humana.

Aliás, diga-se que já no nosso primeiro grupo estudado, o cobaio C_5 foi inoculado com pús animal do cobaio C_1 .

Si há alguma falha em nosso trabalho, é não termos estudado em cobaios protegidos pela exaltação retículo-endotelial, o comportamento do Sistema de Kiyono e Aschoff em face de animais infectados com pús humano ou animal.

O estudo de animais componentes deste grupo pode ser feito no quadro nº 5.

QUADRO N.º 5

CLASSIFICAÇÃO	PESO	SEXO	CAUSA MORTIS	PERIODO DE OBSERVAÇÃO	ZONA DE INOCULAÇÃO	MATERIAL INFECTANTE
C_{20}	450 g.	M.	Bronco-pneumonia	12 dias	Testículo esquerdo	Pús humano
C_{21}	500 g.	M.	Bronco-pneumonia	18 dias	Testículo esquerdo	Material cultural Amostra W. P. V.
C_{27}	450 g.	M.	Bronco-pneumonia	33 dias	Testículo esquerdo	Pús humano
C_{28}	540 g.	M.	Bronco-pneumonia	40 dias	Testículo esquerdo	Material cultural Amostra W. P. V.
C_{29}	475 g. 560 g.	M.	Sacrificado	75 dias	Testículo esquerdo	Material cultural Amostra R. G. M.
C_{31}	610 g. 370 g.	M.	Blastomicrose brasileira	89 dias	Testículo esquerdo	Pús humano
C_{32}	575 g.	M.	Ignorada	133 dias	Testículo esquerdo	Material cultural Amostra W. P. V.
C_{34}	950 g.	M.	Sacrificado	142 dias	Testículo esquerdo	Material cultural Amostras R. G. M. e W. P. V.

O material infectante foi empregado na dose de 1cc. quando se tratou de suspensões de cultura e 0.5 cc. quando pús humano.

No quadro supra, constatamos, ainda como nos anteriores, que nos animais mortos precocemente, a causa foi ainda a bronco-pneumonia, ao passo que os que resistiram foram por nós sacrificados.

Com exceção dos cobaios C_{21} e C_{24} que no decorrer do período evolutivo da infecção sofreram grandes baixas de pêso, os demais não foram influenciados pela doença ou então abateram muito pouco.

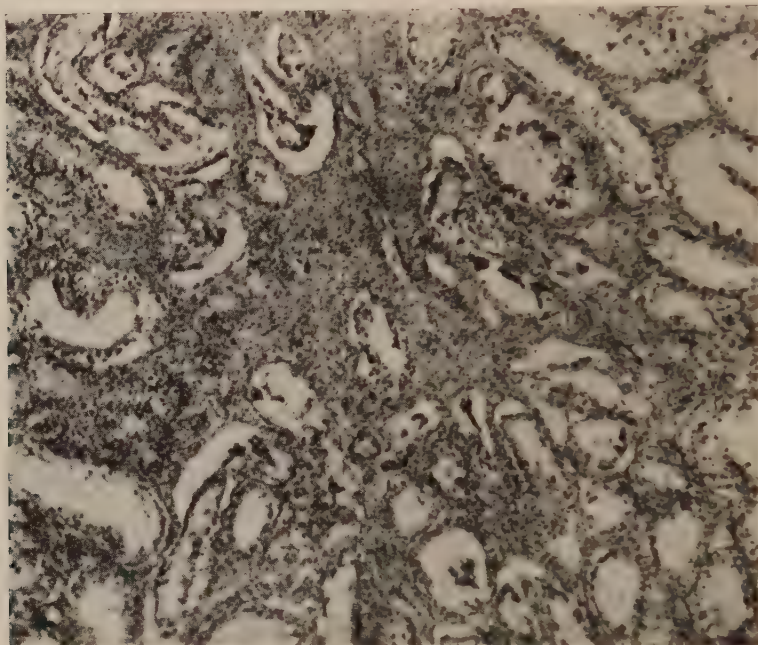


Fig. 20 — Coboio C_{28} , 250 x.

O período experimental variou nesses animais de 12 a 142 dias. Para maiores detalhes, passaremos ao quadro nº 6 que nos dará uma melhor impressão do conjunto dessa fase da experiência.

No quadro a seguir notamos a um exame rápido dos animais apresentados que logo após à inoculação, a primeira manifestação objetiva foi a atrofia do testículo infectado.

Esse fato chama nossa atenção pois ele já se verificou no grupo experimental de animais com S. R. E. exaltado. No caso de animais com o conjuntivo histiocitário bloqueado, não se verificou essa atrofia e, muito ao contrário, o testículo sede do processo, era tomado de um vultoso edema, que ao ceder, deixava em seu lugar inflamação aguda, evoluindo rapidamente para a supuração e fistulisação.

A supuração e a fistulisação do testículo e da bolsa escrotal foi por nós constatada neste último grupo de experiências, entretanto

QUADRO N.º 6

CLASSIFICAÇÃO	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄
DATA DA INOCULAÇÃO	5-1-1944	25-10-1944	25-10-1944	25-10-1944
OBSERVAÇÕES	A partir de 18-1-1944, notamos atrofia aparente do testículo esquerdo. Em 26-1-44 ulceração diminuta no ponto de inoculação. Em 10-2-44, o testículo começa a aumentar de volume (tamanho de um ovo de pombo), aderente aos varios planos e com fistula onde se escoou muito pús. 30-3-44-Cobaio emagrecido. Testículo comparavel a uma noz. Ulceração do tamanho de uma lentilha. Pés do cobaio 370 g. Colheita de pús para exame direto e cultura. Morte do animal em 3-4-1944, provavelmente motivada pela doença experimental.	Apartir de 17-11-1944, notamos inicio de atrofia testicular que se acentuou progressivamente estabilizando-se a partir de 18-12-44. Até a morte do animal, em 7-1-1945, quando foi sacrificado, não se constatou outra qualquer manifestação, salvo a atrofia mencionada.	Notamos os primeiros sinais de atrofia a 17-11-1944. Estes sinais acentuaram-se até 14-2-1945, quando além da atrofia, o animal apresentava dor local à palpação. Encontrado morto ficou na geladeira até 9-3-1945, quando pela autopsia foram retirados apenas os testículos pois, o estado de conservação do animal era precário.	Examinado em 17-11-1944, encontramos epididimo volumoso despertando viva reação do animal à palpação. Testículo iniciando atrofia que se acentua progressivamente. Pela palpação tem-se a impressão de que esses órgãos estão fixados aos planos vizinhos. Em 14-2-1945, a aparência de fixação do órgão desapareceu. Testículo com grande atrofia. Sacrificado em 14-3-1945.
CLASSIFICAÇÃO	C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈
DATA DA INOCULAÇÃO	12-4-1945	12-4-1945	5-6-1945	5-6-1945
OBSERVAÇÕES	Animal observado pelo curto periodo de 12-4-1945 a 20-5-1945. Neste intervalo constatou-se apenas sensível atrofia testicular. Morte do animal em.... 20-5-1945.	Durante o periodo de observação deste animal que foi apenas de 18 dias, o testículo que apresentou atrofia inicial retomou suas dimensões habituais. Dada a morte prematura do animal, aliás proveitosa para nossa observação, não foram constatadas outras modificações. Morte dos cobaios em 30-4-45.	Após a atrofia inicial, seguiu-se o aumento volumétrico do órgão. Abscesso da parede da bolsa escrotal evoluindo rapidamente para a supuração. Epiderme do revestimento desse abscesso congesta e despertando viva dor à palpação. Morte do animal em.... 17-6-1945.	Observado em 7-6-45, este animal apresentou testículo fixo e em situação alta sendo este deslocamento em consequência do abscesso da parede da bolsa escrotal em formação. Em 28-6-45, abscesso já constituído acha-se fistulizado, eliminando pela fistula pús espesso e branco amarelado. Morte do animal em 8-7-1945, em consequência de bronceo-pneumonia. Nessa ocasião foi colhido material para inoculação, pesquisa de <i>Paracoccidioides</i> e sementeira.

quando tal ocorreu, foi sempre precedido de atrofia testicular. Como interpretar esta atrofia, parece-nos um problema difícil, pois si analisamos um processo regressivo e atrófico na zona de penetração da agulha o mesmo encontramos à distância, longe portanto da ação direta do trauma.

Seria ela conseqüência da compressão do material infectante de um lado e da distensão tissular do outro ?

Não nos foi possível firmar um critério histológico sôbre esse aspecto anatômico. Entretanto, o que aceitamos como seguro é que esta atrofia não tem como causa primária o processo específico expe-

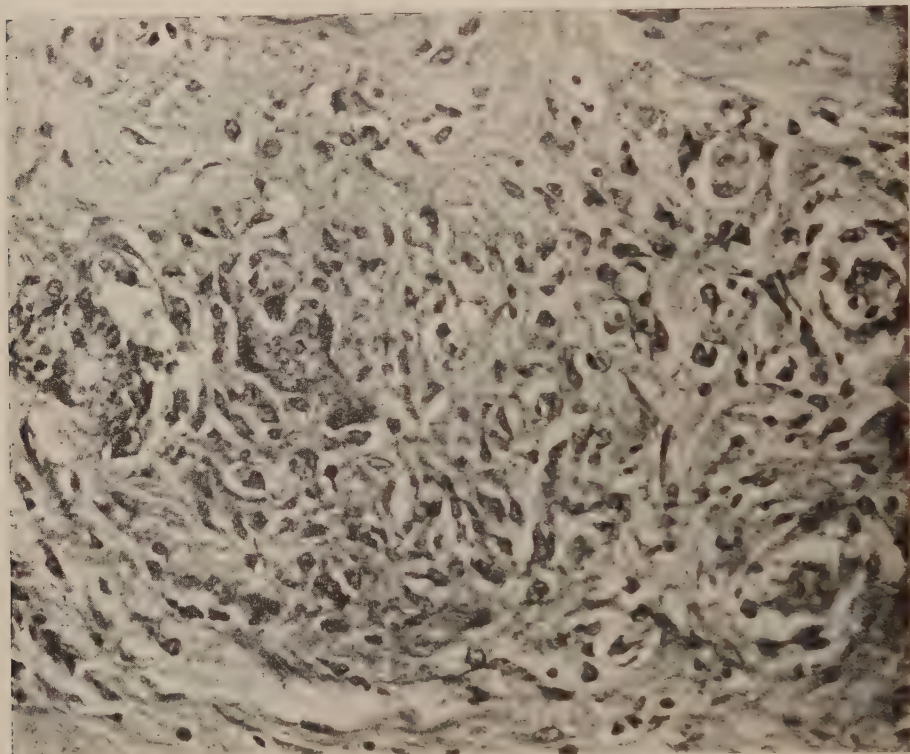


Fig. 21 — Cobaio, estrutura tuberculóide franca, rica em parasitos, no interior de gigantocitos. Coleção do Dr. Padilha Gonçalves.

rimental. Evidente é o fato de que o testículo, órgão de extrema delicadeza estrutural e funcional, sofre direta ou indiretamente a influência do trauma.

Estudo anátomo-patológico

Cobaio C₂₁ — Exame macroscópico: Animal extremamente emagrecido, com atrofias musculares generalizadas. Pulmões de aparência normal. Hipertrófia ganglionar generalizada, sobretudo o gânglio inguinal esquerdo que se apresentava duro e volumoso e de coloração pardo escura. Baço de aparência normal. Testículo esquerdo volumoso, de tamanho comparavel a uma nóz, aderente a todos os planos vizinhos, e formando com epididimo um bloco único. A parte central do testículo achava-se transformada numa cavidade cheia de pús amarelo, espesso. Ulceração da bolsa escrotal.

Exame microscópico — a) Pulmões de estrutura normal, si bem com zonas de infiltração linfocitária. Pelo aspecto da estrutura pulmonar é possível afastar a bronco-pneumonia como a causa primária da morte do animal.

b) Baço de estrutura normal.

c) Gânglios tráqueo-brônquicos, mesentéricos de estrutura normal si bem com hiperplasia linfocitária. Gânglio inguinal esquerdo apresentando fibrose como que encistando processo inflamatório constituído de histiócitos, polimorfo-nucleares neutrófilos e de permeio a êsse infiltrado, numerosos parasitos (fig. 16).

d) Testículo esquerdo (êste órgão foi séde de lesões muito interessantes): Testículo abcedado, apresentando no seu interior cavidade contendo ganga

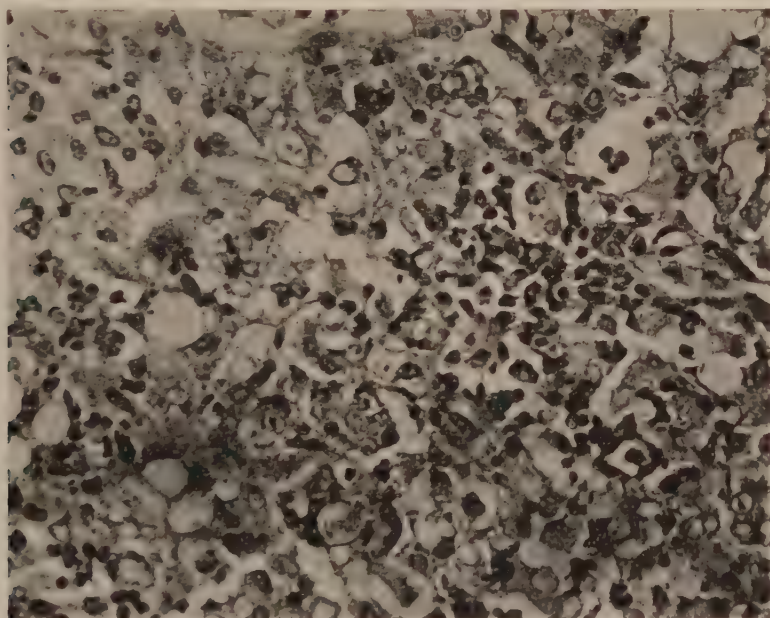


Fig. 22 — Cobalo C₇₇, testículo, estrutura tuberculóide franca, rica em parasitos sempre no interior de elementos retículo-endoteliais.

de piócitos e de polimorfo-nucleares neutrófilos. No meio desse material em desagregação, ha grande quantidade de parasitos, bem como suas cápsulas varias.

Limitando êsse abcesso e constituindo-se em parede, notamos uma estrutura inflamatória aguda representada por neutrófilos em quantidade apreciavel de mistura aos quais assinalamos abundância de *Paracoccidioides* em vários períodos evolutivos.

A proporção que nos afastamos da teca limitante interna, essa estrutura é substituida por túnica formada de discreta reação colágena com presença de numerosos fibrócitos e diminuição do denso infiltrado polimorfo-nuclear neutrófilo. Entretanto a quantidade de parasitos não diminue (fig. 17).

Este aspecto histológico assemelha-se profundamente ao encontrado no testículo de animais com bloqueio do S. R. E.

Cobaio C₂₂ — Exame macroscópico: Pulmões de aspecto normal. Gânglios hipertrofiados. Baço de aspecto granuloso. Testículo apresentando notável atrofia, comparado com o órgão direito de aspecto normal.

Exame microscópico: a) Estrutura pulmonar normal.

b) Gânglios hiperplasiados mas sem lesão.

c) Baço com acentuada hiperplasia da pólpa branca (corpúsculos de Malpighi).

d) Testículo esquerdo: Notável atrofia dos tubuli semini (fig. 18). No tecido intersticial do testículo, ninhos de células epitelióides e de histiócitos,

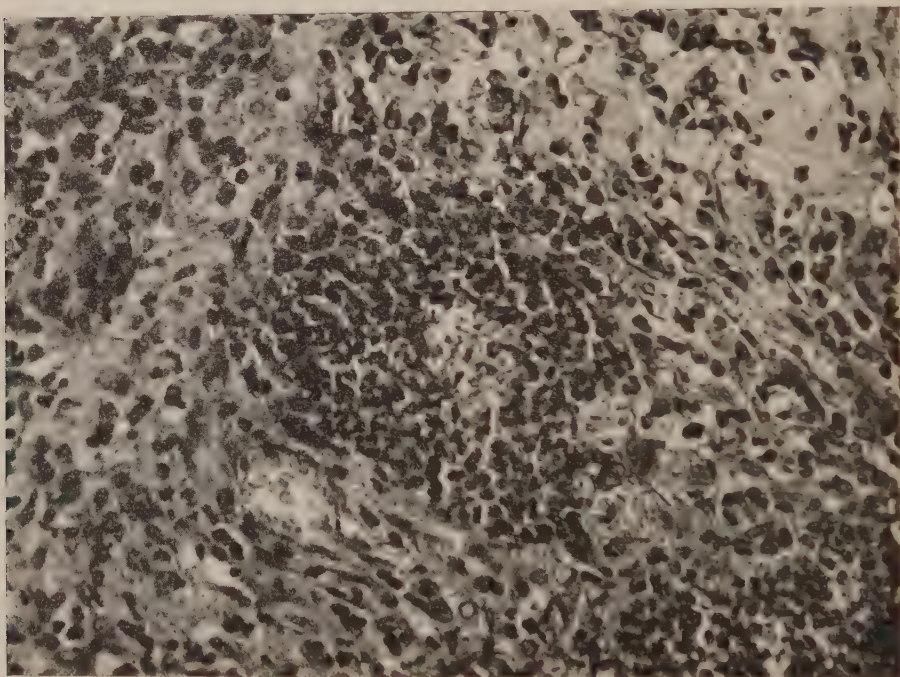


Fig. 23 — *Cobaio C₂₂*, 450 x.

encontrando-se por vezes alguns gigantocitos. Esta estrutura assume o aspecto dos quadros histológicos de arquitetura sarcóide.

As lesões mais interessantes foram vistas no epidídimo e na túnica de tecido conjuntivo frouxo situada entre o testículo e o epidídimo. Nessas regiões encontramos uma densa infiltração constituída de histiócitos, raros linfócitos, grande quantidade de células epitelióides e algumas gigantes. É portanto a reprodução do aspecto sarcóide já assinalado no testículo deste animal.

O que nos despertou interesse foi o fato de assinalarmos neste infiltrado, numerosas células indiscutivelmente de natureza histiocitária mas apresentando dois ou mesmo três núcleos. Admitindo-se que a célula epitelióide e o gigan-

tocito têm origem no histiócito, a verificação desses achados histológicos vem demonstrar uma vez mais a veracidade dessa hipótese. Esses aspectos descritos para a túnica de separação testículo-epididimária podem ser vistos nas figs. 18 e 19. É digno de nota a ausência absoluta de parasitos.

Cobaio C₂₃ — Exame macroscópico: Dada a má conservação das vísceras deste animal, guardado em geladeira, foram as mesmas abandonadas retirando-se para exame apenas o testículo esquerdo, que se encontrava, comparado ao órgão direito, com atrofia pronunciada.

Exame histológico: No testículo fomos encontrar as mesmas lesões descritas para o cobaio anterior C₂₂, isto é, um granuloma hiperérgico onde não foram encontrados parasitos ou suas cápsulas. Deixamos de fazer sua descrição porquanto seria uma simples repetição.

Cobaio C₄₂ — Exame macroscópico: Pulmões de aparência normal. Gânglios hipertrofiados. Baço de aspecto e volume normais. Testículo esquerdo com atrofia acentuada em relação ao órgão direito, tomado como testemunho. A assinalar temos apenas o estado de emagrecimento deste animal.

Exame microscópico: a) Pulmões de aparência histológica normal.

b) Gânglios com hiperplasia linfóide.

c) Baço de estrutura normal.

d) Testículo esquerdo com as lesões que se seguem: Acentuada atrofia dos tubuli seminí. Este aspecto de atrofia foi assinalado nos cobaios C₂₂ e C₂₃. No tecido intersticial do testículo, ninhos de células epitelióides e de linfócitos: raras células gigantes. No epidídimo e no tecido conjuntivo frouxo de separação testículo-epididimário, assinalamos granuloma hiperérgico de estrutura tuberculóide. Estes infiltrados primaram pela ausência de parasitos ou suas cápsulas.

É digno de nota o fato da semelhança extrema entre as estruturas encontradas nos cobaios C₂₂, C₂₃ e C₂₄. Muito mais importante é a analogia estrutural apresentada pelos animais supra mencionados e àqueles que tiveram uma proteção dada pela exaltação do S. R. E.

Cobaio C₂₅ — Exame macroscópico: Pulmões com hepatização vermelha. Gânglios, sobretudo inguinais, hipertrofiados. Baço de aparência normal. Testículo esquerdo atrofiado e duro, apresentando ao corte, nódulo de grande consistência, localizado no centro do órgão.

Exame microscópico: a) Pulmões com denso infiltrado inflamatório agudo. Pontos hemorrágicos em várias áreas pulmonares e exudato bronquiolar.

b) Gânglios com hiperplasia estrutural mas sem lesão.

c) Testículo esquerdo apresentando tecido granulomatoso invadindo apenas o tecido intersticial, sendo que os tubuli seminí acham-se com sensível atrofia, resumindo-se por vezes apenas à sua túnica germinativa. O infiltrado situado no tecido intersticial é constituído de linfócitos, histiócitos, estes em quantidade apreciável; grande quantidade de células epitelióides e gigantes. Esta estrutura é tipicamente tuberculóide. Neste infiltrado encontramos para-

sitos que se achavam sempre no interior de gigantócitos. Tal aspecto estrutural foi encontrado no epidídimo e no tecido conjuntivo frouxo de limitação entre o testículo e o epidídimo.

Cobaio C₂₆ — Exame macroscópico: Pulmões com hepatização vermelha. Gânglios normais. Baço normal. Testículo esquerdo normal. Vaginal e tecido de sustentação do epidídimo envoltos em tecido de sustentação congesto.

Exame microscópico: a) Exudato inflamatório agudo pulmonar.

b) Gânglios e baço de estrutura normal.

c) Testículo esquerdo: Não foram assinaladas lesões dignas de nota a não ser um processo de vaginalite de aparência inespecífica.

Este fato merece uma nota especial, pois segundo verificações de OLÍMPIO DA FONSECA FILHO, nem sempre é possível obter no cobaio a doença experimental. Este foi o único neste grupo em que não se organizou qualquer estrutura de defesa, bem como não encontramos presença de elementos parasitários.

Cobaio C₂₇ — Exame macroscópico: Pulmões com hepatização vermelha. Gânglios inguinais, ilíacos e tráqueo-brônquicos hipertrofiados. Baço de aparência normal. Testículo esquerdo de aparência normal si bem de situação alta. Grande abcesso localizado na bolsa escrotal esquerda, de tamanho comparável ao de uma avelã.

Microscopia: a) Gânglios com hiperplasia linfóide sem apresentar lesões.

b) Testículo esquerdo: A parte central do testículo está transformada em vasta cavidade contendo massa de piócitos e polimorfo-nucleares neutrófilos. Nas zonas de supuração centro testicular ha um número limitado de parasitos e grande número de membranas celulares.

Organizada em parede limitante desta cavidade, ha uma túnica de estrutura tuberculóide riquíssima em parasitos encontrados no interior de histiócitos e de gigantocitos (fig. 22).

Mais para o exterior desta estrutura, encontramos uma intensa fibrose que se continua com uma paqui-vaginalite. Em certos pontos do testículo, entre o infiltrado reacional tuberculóide e a túnica esclerosa da vaginal, encontramos alguns tubos seminíferos recalcados e parcialmente atrofiados. Epidídimo com estrutura tuberculóide apresentando número reduzido de parasitos.

Não nos foi possível fazer exame histológico das demais visceras.

Cobaio C₂₈ — Exame macroscópico: Pulmões com grandes áreas de hepatização vermelha. Gânglios tráqueo-brônquicos, ilíacos e inguinais apresentando hipertrofia notavel, sendo que o primeiro assume proporções comparáveis às de um grão de arroz cosido. Baço de aparência normal. Testículo esquerdo de volume normal e de situação alta. Elementos do cordão e epidídimo envoltos em tecido conjuntivo frouxo congesto. Pele de revestimento da bolsa escrotal hiperemiada, edemaciada e apresentando pequeno pertuito de onde se escôa pús em muito reduzida quantidade.

Exame histológico: a) Pulmões: Exudato inflamatório agudo inespecífico, com elementos inflamatórios intra-bronquiolares.

- b) Gânglios com acentuada hiperplasia linfóide, mas sem lesões.
- c) Baço de estrutura normal.
- d) Pele de revestimento da bolsa escrotal: Notável infiltrado inflamatório agudo onde predominam os elementos polimorfo-nucleares neutrófilos. De permeio a êsse infiltrado são encontrados alguns parasitos. Contudo, em certos pontos, notam-se micro-abscessos constituídos a custa de neutrófilos e centralizados algumas vezes por numerosos parasitos (fig. 23).
- e) Testículo: o aspecto estrutural assume outra feição, pois assinalamos nos pontos lesados a substituição dos tubuli semini, em parte necrosados, por infiltrado constituído de histiócitos, linfócitos, raras células gigantes tipo corpo estranho e algumas células epitelióides.

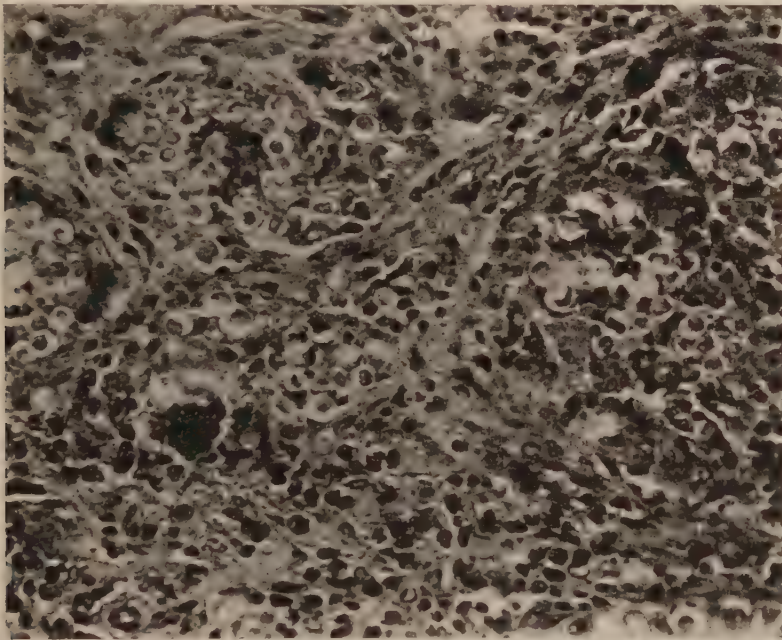


Fig. 24 — Cobaio C₂₈, testículo. 450. x.

De permeio a este infiltrado, de características *pre-tuberculoide* são vistos numerosos parasitos livres ou no interior de gigantocitos (fig. 24). Ao passo que as lesões da bolsa escrotal caminham para a supuração franca, as do testículo evoluem para uma futura organização tuberculoide.

As lesões encontradas no presente animal, marcam uma fase de transição estrutural.

No estudo crítico deste último grupo experimental, nossa atenção volta-se para os aspectos histo-fisiológicos assumidos pelos diversos infiltrados reacionais formados em defesa do organismo animal que abandonado aos seus próprios recursos, reproduz não só os quadros

anteriormente vistos, como permite a organização de outros aspectos fisio-patológicos ainda não encontrados na experiência animal, si bem conhecidos na clínica humana.

Não resta dúvida ser este o grupo de maior importância patológica, por ser aquele que preenche as condições observadas no homem, quando afetado pela blastomicose brasileira.

Nos animais componentes deste grupo, tivemos oportunidade de encontrar as estruturas reacionais mais diversas como veremos em breve nesta rápida resenha.

Para iniciar, queremos frizar que segundo OLÍMPIO DA FONSECA FILHO, o cobaio não é o animal de escolha para o estudo da blastomicose brasileira e pela sua observação, quando este animal é experimentado, nem em todos há organização de infiltrados reacionais.

Neste particular, nosso cobaio C₂₆, não apresentou lesão específica localisada, quer no tecido intersticial do testículo ou na estrutura conjuntiva frouxa epididimária. Entretanto, localizamos exudato inflamatório ainda que inespecífico, na serosa vaginal. Este animal, que recebeu a mesma dose infectante que os demais, constituiu a *única exceção*, neste grupo experimental.

Nos animais restantes, foram assinaladas lesões que variaram de aspecto como podemos apreciar no comentário seguinte:

O cobaio C₂₁ deste lote, ostentou lesões do tipo inflamatório agudo, com predominância de polimorfo-nucleares neutrófilos e piócitos, constituindo grande abscesso. Nas paredes limitantes deste abscesso, predominaram os elementos reacionais inespecíficos acompanhados de quantidade de parasitos que ultrapassou qualquer expectativa.

Além das lesões testiculares, registramos lesões específicas do mesmo tipo no gânglio inguinal esquerdo. O tipo histológico encontrado neste cobaio, preenche o quadro desenvolvido naqueles com S. R. E. bloqueado. Isto vem demonstrar que durante o período experimental, por circunstâncias alheias ao nosso domínio, o S. R. E. do cobaio em apreço entrou em falência, reproduzindo o aspecto do bloqueio (figs. 17 e 18).

No cobaio C₂₈, assinalamos duas estruturas diversas segundo a séde onde se instalaram, assim vejamos: nas lesões que se arregimentaram na pele da bolsa escrotal, predominou o quadro inflamatório agudo, com a formação de micro-abscessos centralizados de parasitos. O exudato dos micro-abscessos era formado exclusivamente de polimorfo-nucleares neutrófilos e piócitos. Este aspecto lembra o encontrado no cobaio C₁, pertencente ao grupo de animais bloqueados e observados 198 dias. Orlando tais micro-abscessos há atmosfera de exudato polimórfico, organizado à custa de neutrófilos, linfócitos e histiócitos (fig. 23).

Em plena massa testicular, a estrutura foi diversa nas suas características fundamentais, pois neste exudato, o neutrófilo cede lugar ao aparecimento da célula epitelióide. Apesar da existência de grande número de parasitos, não encontramos os micro-abcessos que estigmatizaram as lesões da pele da bolsa escrotal. A estrutura apresentada é tipicamente *pre-tuberculóide* (fig. 24).

No cobaio C₂₇, registramos uma estrutura tuberculóide franca, rica em parasitos sempre no interior de histiócitos ou gigantocitos (fig. 22). Este exudato reacional cerca uma cavidade contendo pús, e recalca de encontro à vaginal, restos de tubos seminíferos já alterados.

No cobaio C₂₆, verificamos lesões sédiadas exclusivamente no tecido intersticial do testículo e no tecido conjuntivo frouxo do epidídimo. Estas lesões primaram na sua organização em arquitetura tuberculóide, com reduzido número de parasitos sempre no interior de gigantocitos. É este o tipo histológico mais freqüente nas lesões histológicas humanas (figs. 20 e 21).

Nos cobaios C₂₂, C₂₃, e C₂₄, a estrutura divergiu sensivelmente das precedentemente assinaladas e constou de granulomas hiperérgicos sarcóides, constituídos de células gigantes, epitelióides e histiócitos, não sendo notada a presença de parasitos ou seus vestígios. O quadro histológico assinalado, atesta a vitória do organismo sobre o parasito aproximando-se, ao registrado nos animais apresentando exaltação retículo-endotelial (figs. 18 e 19).

Dada a circunstância especial de termos trabalhado neste grupo com material infectante de duas procedências, isto é, humana e cultural, devemos frizar aqui o fato de que com o segundo material, predominou sempre a estrutura reacional de tipo tuberculóide, pouco habitada, como aconteceu com o cobaio C₂₅ ou mesmo sem vestígio deste como se verificou nos cobaios C₂₂, C₂₃ e 24, que ostentaram arquitetura sarcóidica. Este fato vem levantar a hipótese de que o *Paracoccidioides* mantido em cultura, perde um pouco de sua virulência pela diminuição de seu poder toxigênico. Em material de procedência humana, dada a circunstância do alto poder toxigênico, a resposta fornecida pelo organismo do animal experimentado é menos eficiente, em virtude da ação bloqueante exercida pela exotoxina paracoccidiana.

Queremos uma vez mais frizar que neste grupo experimental, todos os tipos histo-patológicos, quer os assinalados nos grupos anteriormente estudados, quanto os encontrados em clínica humana, fizeram sua representação nas diversas lesões testiculares dos cobaios analisados.

CONCLUSÕES

A blastomicose brasileira, doença humana produzida pela ação do *Paracoccidioides brasiliensis*, agindo sobre o organismo infectado, ostenta um quadro anatomo-clínico, função das condições atuais em que se encontra o S. R. E.; — foi esta a hipótese que nos levou ao estudo experimental, cujos protocolos acabamos de analisar.

Na blastomicose brasileira, pelo menos experimental, podemos considerar a evolução do mal em duas fases: Inicialmente, o fungo solicita por parte do organismo, uma reação inespecífica, promovendo a formação de micro-abcessos (fig. 23).

Si o organismo reage, o S. R. E. entra em cena e constroe estruturas defensivas que englobam o parasito. Vemos então surgir uma segunda fase evolutiva, na qual o *Paracoccidioides* prolifera dentro de elementos reticulo-histiocitários (figs. 21 e 22). Esta segunda fase evolutiva da micose em estudo, é portanto caracterizada pelo aspecto granulomatoso, na qual o germe parasita o S. R. E. O aspecto microscópico ulterior depende da energia de reação do organismo sôbre o cogumelo.

Enquanto procedemos ao bloqueio sistemático de animais para experiência, observamos que os quadros histológicos mantiveram-se uniformes, arranjando-se apenas em arquiteturas inflamatórias agudas e de aparência inespecífica (figs. 5, 7, 8, 9 e 10).

Como vimos linhas acima, mesmo no bloqueio mais avançado, ha vicariância histiocitária, de sorte que, não somente fibrócitos mas também elementos endoteliais linfáticos e sanguíneos substituem em parte a função reticulo-histiocitária inibida, criando destarte uma barreira defensiva, permitindo ao organismo um último esforço no sentido de opor resistência aos agentes agressivos.

Nestas condições, em animais com bloqueio demorado, foi-nos possível constatar um esboço de resistência, demonstrada pelo aparecimento de gigantocitos e algumas células epitelióides, desfigurando assim a estrutura inflamatória aguda primitiva (figs. 4 e 6).

Entretanto, apesar desta transformação histológica, encontramos de per-meiio a este novo aspecto, micro-abcessos em formação, constituídos de aglomerados de polimorfo-nucleares neutrófilos centralizados por células parasitárias. Os elementos mais próximos dos cogumelos patogênicos já constituem verdadeira corôa de piócitos. Êste quadro histopatológico pode ser observado na fig. 3.

O bloqueio não permite, assim visto, uma oposição eficaz por parte do organismo, deixando ao animal inibido, apenas os recursos inoperantes das reações inflamatórias inespecíficas. É como se o S. R. E. ficasse indiferente á infecção. Sua inibição traduz-se histologicamente pela anergia reacional.

Em oposição ao bloqueio, o sistema de Aschoff está sujeito á exaltação, processo em que impera a excitação reticulo-histiocitária, atestada pelo seu elevado poder granulopéxico. A célula histiocitária, é capaz de fixar os elementos parasitários, destruindo-os sem maior obstáculo. Êste fato é conseguido mediante a ação de substâncias estimulantes, capazes de aumentar a granulopexia.

A excitação do sistema conjuntivo-histiocitário traduz-se histologicamente nos quadros de estrutura hiperérgica. Êste fato foi por nós patenteado experimentalmente como constatamos nas figs. 11 a 15. Estas fotografias demonstram-nos varios ensinamentos; assim vejamos:

a) Os processos reativos do S. R. E. desenvolvem-se nos locais onde é mais frequente sua condensação. Assim, as sédes escolhidas no aparecimento dos quadros histológicos, foram os tecidos intersticiais do testículo e do epididimo, onde a célula intersticial desenvolve, segundo KIVONO, funções histiocitárias. Os tubos seminíferos e os canais epididimários desempenham apenas as funções de sustentáculo das zonas onde os processos reacionais instalaram-se.

b) A estrutura apresentada é preferentemente granulomatosa crônica tipo tuberculóide. Nos preparados histológicos que examinamos, prendeu-nos atenção o fato de termos encontrado células com características histiocitárias e providas de dois e mesmo de três núcleos. Tal achado vem uma vez mais confirmar a proveniência do gigantocito, desvio patológico do histiócito.

c) Nestes cortes histológicos, encontramos vestígios de parasitos, apenas nos preparados oriundos de animais com período curto de infecção. Tais vestígios resumiam-se às capsulas vazias de parasitos mortos.

Há, portanto, um contraste absoluto entre o aspecto histológico ostentado pela exaltação, quadro de hiperergia tissular e o encontrado no bloqueio, onde impera a anergia.

Quando abandonados aos seus recursos naturais de defesa, os animais inoculados apresentaram-nos surpresas histológicas. Vejamos o que de interessante foi registrado:

a) Processos inflamatórios agudos de aparência inespecífica, similares aos obtidos nos animais em estado de bloqueio (fig. 17).

b) Micro-abcessos centralizados por parasitos, acompanhando lesões de estrutura pre-tuberculóide (figs. 23 e 24). Este processo parece traduzir o quadro histológico de início da blastomicose, e dele origina-se a estrutura tuberculóide franca.

c) Estruturas tuberculóides francas, e presença de parasitos no interior de gigantocitos (figs. 21 e 22).

d) Estruturas sarcóidicas, sédiadas no tecido intersticial do testículo e do epididimo, como foi por nós encontrado nos cobaios C₂₂, C₂₃ e C₂₄. Este aspecto pode ser visto nas figs. 18 e 19.

O quadro histológico ostentado pelos animais supracitados, superpõe-se ao encontrado nos cobaios com exaltação do S. R. E.

Que deduzir destes fatos?

a) A regra de Jadassohn e Lowandowsky, estudada em Dermatologia, e cujo enunciado pode ser assim resumido:

“Todos os processos imuno-alérgicos que destróem ou atenuam rapidamente os micro-organismos (destruindo ou atenuando seus produtos tóxicos) desenvolvem estruturas tuberculóides”,

tem aqui uma confirmação experimental.

b) A exotoxina paracoccidiana tem ação inibidora sobre o S. R. E.

c) Considerando que apenas em animais infectados a partir de cultura, obtivemos estruturas tuberculóides, conclue-se que o cultivo atenua a virulência do *Paracoccidioides*, consequência provável da diminuição na produção de sua exo-toxina.

d) Diante dos achados experimentais, é-nos possível avançar um pouco mais no estudo da clínica, prevendo estruturas histológicas e prognósticos.

Realmente, com o estudo experimental levado a efeito, permitimo-nos ao arrojo de tirar conclusões clínicas, quanto ao mecanismo de progressão da micose em aprêço, baseados em elementos concretos; assim vejamos: a doença evolue localmente, limitada na sua invasão pelas barreiras agressivas do sistema retículo-endotelial. Esta afirmativa encontra apoio nos achados histológicos de animais com lesões testiculares tipo tuberculóide.

Tal fato é condizente com os aspectos anatomo-patológicos dos casos clínicos de evolução demorada e nos quais o paciente é portador de um bom estado geral.

Quando por circunstâncias fortuitas, o limiar defensivo baixa, fato verificado experimentalmente no bloqueio animal, as estruturas hiperérgicas cedem lugar aos quadros de tipo inflamatório agudo. Vemos então o parasito dominar a cena, e ao seu lado aparece o polimorfo-nuclear neutrófilo.

É o aspecto criado pelo bloqueio animal e que se traduz no homem pelas formas evolutivas malignas, dominadas pela toxemia.

No animal êste conjunto foi conseguido mediante a inibição do S. R. E. sob a ação de corantes vitais. No homem, tal "desideratum" é determinado pela toxemia paracoccidiana que tolhe as atividades do sistema, desorganizando estruturas ou impedindo arranjos tissulares do tipo granulomatoso.

Quando este aspecto anátomo-clínico se verifica, o parasito vence, sem grandes obstáculos, as barreiras linfáticas, invadindo gânglios da vizinhança. É o que se constata freqüentemente na clínica e que foi obtido experimentalmente no cobaio C₂₁.

Da maneira de progressão através dos linfáticos, tivemos a comprovação nos infiltrados localizados no canal torácico do cobaio C₁, demonstrando ser a via linfática, a maneira de disseminação da parasitose, mesmo em animais bloqueados, e não a hemática.

Esta última entretanto não deve ser esquecida, pois quando o parasito franqueia os grandes linfáticos, a via hematogena passa a ser sua corrente disseminadora. Nestes casos, vamos encontrar as formas de blastomicose brasileira comparáveis à granuloma tuberculosa, felizmente achado raro da clínica.

Nossas experiências com animais apresentando exaltação do S. R. E. confirmam o processo de cura da blastomicose brasileira, sob a ação dos compostos mico-estáticos.

De fato, no tratamento pelos derivados sulfamídicos, êstes atuam inibindo o parasito, permitindo destarte maior amplitude de ação do conjuntivo histiocitário, que consegue debelar a micose.

Quando experimentamos, utilizando animais com exaltação histiocitária e material infectante proveniente de culturas pouco toxígenas, pela sua permanência prolongada em meios artificiais, reproduzimos o estado estático criado pelas "sulfas".

Este aspecto experimental, veio mostrar-nos que, como já dissemos em outra oportunidade, não é só o sulfa-derivado que atua, muito ao contrário "o grande papel, o da cura, pertence ao S. R. E."

INDICAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F., 1939, *Mycologia Medica*, Cia Melhoramentos, S. Paulo.
- DU BOIS, A. H., 1934, *Physiologie et Physiopathologie du S. R. E.*, Masson & Cie., Paris.
- MIDY, R., 1936, *Le conjonctif histiocitaire*, Masson, & Cie., Paris.
- PERYASSÚ, D., 1942, Ação dos preparados sulfamidicos na blastomicose brasileira. *An. Brasil. Dermatol. e Sifilog.*, 17 (4): 261-281.
- RAMOS e SILVA, J., 1942, Sobre a forma puramente cutanea da blastomicose brasileira. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 22 (5): 737-741.
- RIBEIRO, D. O., 1940, Nova terapeutica para a blastomicose. *Publicações Medicas*, 12 (1): 36-54.

CORRIGENDA AO CAPÍTULO SIMULIIDAE DOS “ESTUDIOS DE ZOOLOGIA Y PARASITOLOGIA VENEZOLANAS” DO PROF. A. LUTZ¹

C. D'ANDRETTA Jr.

e

MARIA A. V. D'ANDRETTA

Escola Paulista de Medicina, S. Paulo

Departamento de Zoologia, S. Paulo

O capítulo dos simulídeos dos “Estudios de Zoologia y Parasitologia Venezolanas” de A. LUTZ, escrito em colaboração com NUÑEZ TOVÁR, tem apresentado algumas dificuldades para os especialistas da fauna da América Central e do norte da América do Sul, pois as indicações das figuras nem sempre correspondem às espécies em questão. Este fato é facilmente compreensível si dedicarmos um pouco de atenção às palavras de LUTZ no prefácio da referida obra.

Tal falta de correspondência entre as indicações encontradas no texto e mesmo na explicação das estampas e as referidas figuras, seria de menor importância, tornando-se uma questão de simples errata, não fora as interpretações imprecisas que encontramos ao consultar os trabalhos de autores que se dedicam ao estudo dos simulídeos das faunas acima referidas.

Além deste fato, temos o de C. PINTO (2), que ao rever o material que forneceu a fig. 2 da est. 6, ponde identificá-lo como espécie nova, a qual foi descrita com o nome de *Simulium lutzianus*. Julgamos que esta figura representa para LUTZ & TOVÁR o *S. ochraceum* como se pode ler à pág. 46, linha 4:

“La *ninfa* tiene ocho filamentos respiratorios, saliendo de tres ramificaciones; de una nacen dos y de las otras cada vez tres filamentos”.

O equívoco neste caso se resume, portanto, a uma troca entre as figuras 2 e 3.

DAMPF (3) ao estudar a pupa de *S. ochraceum*, escreve à página 34:

¹ Recebido para publicação a 4 de maio de 1946.

"Las branquias de la crisálida que representan Lutz y Továr en la figura 3 de la lámina 6, tienen la primera rama simple, la segunda dividida en tres ramas secundarias, la tercera simple y la cuarta otra vez dividida en tres, lo que no corresponde a la forma de branquias en la especie mexicana, como veremos adelante. Compete a los entomólogos de América del Sur, aclarar de que especie se trata en el supuesto *E. ochraceum* de Venezuela. Me abstengo de designarlo con un nombre nuevo, para no aumentar más la sinonimia de los simúlidos americanos, ya bastante enredada".

Agiu bem DAMPF não dando novo nome à espécie em questão e deixando o problema para os entomologistas da América do Sul, pois trata-se de *Simulium rubrithorax* Lutz, 1909.

Antes que novos equívocos possam surgir, damos à seguir a corrigenda deste trabalho de LUTZ & TOVÁR, baseada na comparação feita entre as descrições do texto e as figuras que as acompanham. Queremos frizar que as correções apresentadas nesta nota dizem respeito estritamente ao trabalho de LUTZ & TOVÁR, e não nossa opinião sobre o assunto, a qual será expressa oportunamente quando publicarmos as observações que estamos coligindo presentemente.

PÁGINA	LINHA	ONDE SE LÊ	LEIA-SE
42	3	(Est. 7)	(Est. 7, fig. 1)
42	24	(Est. 4, fig. 8; Est. 6, fig. 7)	(Est. 4, fig. 3; est. 6, fig. 3)
43	31	...1910	...1910 (est. 6, fig. 1)
45	16	...finos. (Est. 7, fig. 1). Luego...	...finos. Luego...
45	23	(Est. 4, fig. 6. Est. 6, fig. 3)	(Est. 4, fig. 4. Est. 6, fig. 2)
47	13	(Est. 4, fig. 2; est. 6, fig. 3)	(Est. 4, fig. 1; est. 6, fig. 7)
131	27	<i>incrustatum</i>	<i>subnigrum</i>
131	28	<i>rubrithorax</i>	<i>ochraceum</i> *
131	28	<i>ochraceum</i>	<i>rubrithorax</i>
131	28	<i>versicolor</i>	<i>incrustatum</i>
131	28	<i>subnigrum</i>	<i>versicolor</i>

* Como vimos linhas atrás, trata-se de *S. lutzianus* Pinto, 1931, assim como a da est. 6, fig. 2.

REFERÊNCIAS

1. LUTZ, A. & TOVÁR, N., in LUTZ, A., 1928, *Estudios de Zoología y Parasitología Venezolanas*. pp. 1-133, 26 ests., Rio de Janeiro.
2. PINTO, C., 1931, *Simuliidae da America Central e do Sul (Diptera)*. Sépt. reun. Soc. Arg. Pat. Reg. Norte, pp. 662-763.
3. DAMPF, A., 1943, La crisálida de *Eusimulium ochraceum* (Walker, 1860). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 4 (1/2): 33-41, est. 2.

CRÍTICA BIBLIOGRÁFICA

CHALMERS, C. H., 1945, BACTERIA IN RELATION TO THE MILK SUPPLY, 3rd ed., VII + 272 pp., 55 figs. Edward Arnold & Co., London. *

O controle higiênico do leite de consumo das grandes capitais representa um sério problema de saúde pública.

Tratando-se de regiões de climas quentes, situando-se as fontes de produção em distâncias não raro consideráveis, em relação aos centros consumidores, sobretudo se o sistema de transporte não se enquadra dentro do que exige a técnica industrial leiteira, como sucede entre nós, então a verificação das condições físico-químicas e bacteriológicas do produto realizada sistematicamente é de valor definitivo.

É sabido que o leite comum, ao entrar para as nossas Usinas, veicula alguns milhões de germes e centenas de milhares de representantes do grupo coliforme. Depois da pasteurização, segundo a eficiência do trabalho feito, ora maior, ora menor, de acordo com as condições de aparelhagem daqueles estabelecimentos, esse leite apresenta teores microbianos diversos, oscilando entre dezenas de milhares a centenas de milhares em 1 ml. e presença de coliformes em 1 ml., 1×10 , às vezes a 1×100 .

O livro de Chalmers, sobre bactérias em relação com o abastecimento do leite, é de grande auxílio para os que labutam nos laboratórios de controle higiênico do leite.

Na composição desse excelente manual, distribue-se a matéria, abrangendo os exames bacteriológicos rotineiros do leite e da água, a pesquisa das modificações organolépticas, o isolamento e identificação dos germes do leite e o controle dos estabelecimentos que trabalham com o leite, desde a produção até o beneficiamento.

Na segunda parte, faz-se o estudo da técnica bacteriológica geral compreendendo nessa rubrica a montagem dos laboratórios, esterilização do material, preparo de meios de cultura, inoculação, cultura, isolamento e identificação de germes.

Em apêndice, informações sobre o preparo e composição dos meios de cultura, reagentes e corantes, noções sobre microscopia.

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

Nesta última edição, faz o A., completa revisão nas secções relacionadas com o contróle da produção e da tecnologia da pasteurização, aí fixando as aquisições mais recentes sôbre a matéria.

Alexandre Mello.

BRINBLE, L. J. F., 1944, FLOWERS IN BRITAIN,
393 pp., 17 col. pls. 164 figs. Macmillan & Co.,
London. *

Trabalho de vulgarização muito bem feito, este volume apresenta um estudo de conjunto das plantas floríferas, autóctones e cultivadas na Inglaterra.

Contém uma introdução, na qual são expostos com clareza e sobriedade os dados principais de morfologia das plantas e, mais pormenorizadamente, das flores e dos processos de fecundação.

Foi adotado o critério sistemático para grupamento das plantas estudadas e assim são tratadas as dicotilédones dialipétalas, dicotilédones gamopétalas e monocotilédones.

Cada família vem acompanhada de uma breve caracterização e, a seguir, são estudadas as espécies mais comuns dos gêneros, em que se distribuem.

O assunto é exposto de maneira muito agradável e, a propósito, são referidas informações folclóricas e acrescidos trechos literários, principalmente poesia. Isso se faz, entretanto, sem prejuízo das melhores noções científicas de uma atualizada sistemática.

Racionalmente, o estudo se inicia pelas plantas silvestres, passando destas para as de valor econômico, a seguir, para as ornamentais e a nomenclatura latina é acompanhada das designações populares.

Para o leitor brasileiro não deixa de ser curioso o encontro de nomes populares como: *ox-eye*, *moon-daisy*, *Jack-go-to bed-at noon*. Os nossos tinho-ões ou guembés podem ser, lá, *cuckoo-pint*, *lords-and-ladies*, *cow-and-calves* e *Jack-in-the-pulpit*.

Da poesia citada, em que se alinham Shakespeare, Tennyson, Byron e muitos mais, há uma estrofe de Sarah Roberts Boyle "The voice of the Grass" que, para nós, seria assim como a cantiga do capim. Mas é excelente poesia:

Here I creeping, creeping everywhere My humble song of praise.

O volume vem profusamente ilustrado, reservando-se, para as estampas coloridas, os aspectos de conjunto, ao passo que os pormenores de morfologia são acentuados em figuras no texto. Consegue assim reunir, a par de uma ciência atualizada e segura, o prazer de uma leitura pitoresca e variada.

M. Cavalcanti Proença.

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

FRITSCH, F. E., 1935-1945, THE STRUCTURE AND REPRODUCTION OF THE ALGAE. I (1935), II (1945), XV + 791 pp., 245 figs.; XIII + 939 pp., 2 maps., 336 figs., Cambridge Univ. Press. *

Um dos grupos vegetais em que a literatura se tornou mais volumosa é, sem dúvida, o das Algas. Conseqüentemente em nenhum grupo são mais úteis as obras de revisão. E esta é, precisamente, a finalidade da obra do prof. F. E. Fritsch. Adotou como linha mestra a Morfologia, servindo-se dos outros pontos de vista apenas como subsídios para encarar o assunto de maneira concisa e geral, usando a Sistemática como processo de exposição ordenada. A preocupação de exercer um estudo crítico sobre as contradições entre os trabalhos citológicos (mostrando que muitas resultam do fato de se observar a forma em estágios diferentes do ciclo), a sistematização dos dados morfológicos das algas marinhas por meio da Ecologia e da Fitogeografia, a crítica das distinções propostas entre Algas e Flagelados, entre os diversos grupos de Algas, tudo isso revela uma tendência para considerar a forma não mais como uma finalidade de estudo e sim como um meio para chegar ao conhecimento dos fenômenos biológicos. Percebe-se nitidamente por esse livro o início dessa nova etapa da morfologia vegetal, homóloga às revoluções trazidas na Matemática pela Geometria Analítica e na Física pela concepção reticular da estrutura dos cristais. Poder-se-ia aqui parodiar a feliz expressão de Mallard: "Os cristais não são seres geométricos: a forma que os caracteriza é a expressão figurada das propriedades mais íntimas da matéria que os compõe".

Estudos comparativos minuciosos levaram o autor a estabelecer um conceito muito extenso de Alga: algas são todos os organismos holofíticos e seus derivados apigmentados, distinguindo-se de Archegoniatae pela menor especialização dos órgãos reprodutores e pelo caráter menos estereotipado do ciclo vital. É uma definição negativa, justificada em face da grande margem de variação de estrutura, da reprodução e do ciclo biológico. A distribuição em classes adotada é a seguinte: Chlorophyceae; Xanthophyceae; Chrysophyceae; Bacillariophyceae; Cryptophyceae; Dinophyceae; Chloromonadineae; Euglenineae, Phaeophyceae; Rhodophyceae; Myxophyceae.

Não admite demarcação natural entre as Algas e os Flagelados e incluíe as Cyanophyceae como classe, separando-as das bactérias principalmente pela ausência de centoplasma nas últimas. Além disso transformou em classes e até mesmo em ordens várias das antigas divisões de Engler-Gilg.

Trata-se de obra muito útil, porque fornece uma visão geral sólida acerca da morfologia e da reprodução das algas, destinando-se simultaneamente ao estudo e à consulta, dotada de citação bibliográfica abundante e classificada por capítulos.

Luiz Gouvêa Labouriau.

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

BRACHET, J., 1944, EMBRYOLOGIE CHIMIQUE,
509 pp., 127 figs., Masson & Cie, Paris.

A embriologia, a princípio puramente descritiva, recebeu um enorme impulso quando passou para o domínio da experimentação, graças aos trabalhos de W. Roux, Delage, Spemann, Waddington e de tantos outros. Mas foi sómente depois da publicação da obra magistral de J. Needham (*Chemical Embryology*, 3 vols., 1931) que a Química Embriológica se organizou como disciplina autônoma. Os já numerosos trabalhos sobre a química do ôvo e da fecundação foram desde então coordenados para melhor visão de conjunto do mecanismo da morfogênese. J. Brachet que é filho e discípulo do grande embriologista belga A. Brachet, conseguiu no presente volume focalizar os conhecimentos atuais sobre a embriologia e suas relações com a bioquímica da morfogênese. Orientou Brachet a sua obra mais para o ponto de vista biológico do que puramente bioquímico, diversamente do que fizera Needham na *Chemical Embryology*.

Embryologie Chimique compõe-se de doze capítulos abrangendo desde o metabolismo do ôvo até o do organismo em regeneração:

1) Problemas e métodos da embriologia química; 2) Bases químicas do determinismo sexual; 3) Formação dos gametas; 4) Bioquímica da fecundação; 5) Segmentação, metabolismo e divisão celular; 6) Síntese, localização e papel fisiológico dos ácidos nucleicos, crescimento, diferenciação e metabolismo; 7) Embriologia química dos invertebrados; 8) Embriologia química dos óvos de batráquios; 9) Metabolismo do centro organizador e a natureza química da substância indutora; 10) Metabolismo do centro organizador; 11) Bioquímica do organismo em regeneração; 12) Fatos adquiridos, pontos controvertidos e perspectivas do futuro.

Como indicam os títulos dos capítulos o programa é de larga amplitude, tendo sido ventilados não só os fatos adquiridos pela experimentação como as hipóteses de trabalho que nesta disciplina oferecem ainda imensas possibilidades.

Os problemas relativos ao ôvo em repouso e fecundado, à gastrulação, à organogênese e à diferenciação histológica revelam que cada uma dessas fases deve implicar um aspecto metabólico diferente. Assim, no capítulo IX, chama o A. a atenção sobre a possível correlação entre as mudanças bruscas que se verificam no metabolismo glicídico (glicogenólise, glicólise aumentada, quociente respiratório elevado) e a gastrulação. Do mesmo modo, o ôvo fecundado se caracteriza por mudanças nos componentes sulthidrilados (glutation).

Recomendam-se pela sua clareza e riqueza de observações os capítulos referentes ao papel dos ácidos nucleicos no desenvolvimento embrionário e à natureza da substância indutora (evocador).

Bem que pouco se saiba da embriologia química dos invertebrados, o A. reuniu suficientes dados no capítulo VII para permitir uma boa noção de conjunto sobre os conhecimentos atuais. As teorias de Child e de Dalcq e Pasteels sobre a participação dos gradientes na morfogênese são detalhadamente discutidas.

São muito instrutivas as páginas referentes às observações citôquímicas sobre o organizador. Nesse particular o A. fez estudos originais principalmente quanto à distribuição dos compostos sulfhidrilados nos óvos de anfíbios em desenvolvimento. Na neurulação, a placa neural se enriquece em nucleoprotídeos sulfhidrilados, mostrando um gradiente cefalocaudal nítido (p. 359).

É muito útil o primeiro capítulo em que o A. passa em revista os métodos modernos de citoquímica e de histoquímica aplicados ao estudo da embriologia. Refere com algum detalhe as técnicas de Caspersson para a dosagem dos ácidos nucleicos da célula pela espectroscopia de absorção e aos métodos engenhosos de microquímica de Linderström-Lang e de seus colaboradores do Laboratório Carlsberg de Copenhagen. Nesse particular estuda o método sensível do flu-tuador de Linderström-Lang que permitiu a Needham, Boell e outros, determinar o quociente respiratório de fragmento de ovo de anfíbio. Zenthen obteve, mesmo, resultados muito interessantes sobre o consumo de oxigenio de óvos de rã medindo quantidades inferiores a $0,01 \text{ mm}^3$ de oxigenio (pag. 169).

O livro é escrito em linguagem clara e precisa encerrando uma bibliografia abundante no fim do volume (1077 citações). Notamos contudo algumas omissões de importância, assim não são referidos nem o livro de J. Needham — *Biochemistry and Morphogenesis*, publicado em 1942, nem o de Waddington — *Organisers and Genes* (1940), ambos já classicos.

G. G. Villela.

ANDERSON, J., 1945, THE SEMEN OF ANIMALS AND ITS USE FOR ARTIFICIAL INSEMINATION, 155 pp., 19 figs., Imperial Bureau of Animal Breeding and Genetics. *

O presente volume, como os da mesma série, constitue uma revisão do assunto, compreendendo três partes. Na primeira, está consignada toda a literatura referente ao estudo do semen, fatores que influem na sua produção e utilização; na segunda é discutida a aplicação dos métodos de inseminação para as diversas espécies e suas limitações; na terceira são descritas as técnicas de colheita, exame e inseminação. Uma relação bibliográfica até 1943 completa o texto.

É desnecessário encarecer a utilidade e a maneira perfeita com que são realizadas estas "*Technical Communications*" dos "*Imperial Agricultural Bureaux*", alguns dêles já resumidos nesta mesma *Revista*.

Uma rápida referência à distribuição da matéria pode dar idéia do modo como é a mesma tratada. São referidos o volume, motilidade, número de espermatozoides, morfologia, pH, etc. do semen das seguintes espécies: Boi, cavalo, carneiro, porco, cão, rapôsa, coelho, galinha e peru.

Os fatores que influem sobre a produção do sêmen, como glândulas, temperatura, luz, nutrição etc. são estudados a seguir.

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

Ainda na primeira parte são passadas em revista as propriedades físico-químicas do sêmen, a fisiologia do espermatozoide, conservação e transporte do sêmen.

A inseminação artificial é estudada para o gado bovino e ovino, éguas, porcas, cães e raposas, coelhos e aves. Para os mesmos animais são descritas as técnicas de inseminação e finalmente o manejo dos garanhões.

As ilustrações, quase todas fotografias, a não ser diagramas de aparelhos, facilitam a compreensão, por muito elucidativas.

Como os demais, que conhecemos, este volume não desmerece a orientação de utilidade e excelência que os têm inspirado.

M. Cavalcanti Proença.

ROWE, W. H., 1944, TREES AND SHRUBS AND HOW TO GROW THEM, 192 pp., 36 figs., 15 pls. Penguin Books Limited, Wyman and Sons Ltd., London.*

Da coleção *Penguin Handbook* este manual destina-se a todos aqueles que amam as árvores e desejam usá-las no embelezamento de jardins, parques e estradas.

O Autor ensina cousas da morfologia e fisiologia das árvores e arbustos e classifica as árvores em vinte e duas categorias segundo o seu emprego ou aproveitamento (árvores para parques e avenidas, para ruas, para proximidades do mar, para solos secos etc.).

É um trabalho útil que poderá servir de paradigma aos nossos raros e incipientes silvicultores, porquanto Rowe lida, é claro, com plantas de climas diferentes do nosso, sendo poucas as espécies aclimatadas no Brasil contidas em suas bem feitas listas.

Dedica um capítulo ao problema das sébes vivas apresentando um quadro de espécies e variedades com dados sobre a altura das plantas e as distâncias em que devem ser plantadas e outro capítulo às roseiras, terminando com uma relação descritiva das árvores e arbustos mais empregados na ornamentação de cidades e fazendas.

Leonam Azeredo Penna.

RAYNER, M. C., 1945. TREES AND TOADSTOOLS, 72 pp. 18 pls. Faber and Faber, London. *

Co-autor de "Problems in Tree Nutrition", já por nós comentado no número de Dezembro, 1945, desta Revista, Rayner apresenta-nos agora um bem lançado trabalho sobre as associações botânicas entre certos cogumelos e as árvores especialmente nas florestas.

Escrito em linguagem acessível aborda problemas importantes como sejam o da assimilação do azoto e do carbono pelas plantas verdes e o papel dos fungos nesse fenômeno.

As dezoito estampas são ótimas e na de número 17 o Autor mostra 6 mudas de *Pinus nigra*, vulgarmente chamado "pinheiro da Córsega", cultivadas em

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

viveiro e em que foram adicionadas pequenas porções de terra da floresta de Aitone (Córsega). As plantinhas semeadas em mistura de terra *similar* ao solo de Aitone mostram desenvolvimento bem inferior ao das que receberam "very small quantity of rootlets and soil from Corsican forest of Aitone, where this tree is native".

É mais um livro que indicamos para a estante dos silvicultores brasileiros, com múltiplos e graves problemas a resolver.

Leonam Azeredo Penna.

MODES OF DRUG ACTION: A GENERAL DISCUSSION. PUBLISHED IN THE TRANSACTIONS OF THE FARADAY SOCIETY, 1943, vol. 39 (part 12), págs. 319-346. Gurney & Jackson ed., London. *

Este volume constitue mais um dos simposios realizados pela "Faraday Society", publicado em um dos fascículos de "Transactions" da mesma Sociedade, e apresentado em forma de livro.

Passados 10 anos do aparecimento da clássica obra de Clark: "Mode of action of drugs on cells", cujo título é quase igual ao do presente volume, far-se-ia mister a publicação de um novo trabalho sobre a questão, devido o desenvolvimento assumido pela mesma nestes últimos tempos. Aliás, neste capítulo da farmacologia, os investigadores ingleses, especialistas do assunto, muito têm se dedicado e, provavelmente, mais do que qualquer outra escola, têm trazido grande contingente de conhecimentos novos ao problema do modo de ação de diferentes substâncias nos organismos animais.

O simposio é iniciado com uma introdução feita por Sir Henry Dale, e divide-se em duas partes. Na primeira parte, que trata dos aspectos biológicos da ação dos medicamentos, são estudadas as seguintes questões: J. H. Gaddum: O antagonismo dos medicamentos; S. R. Christophers: Metabolismo celular do parasita da malária em relação com o modo de ação dos medicamentos antipalúdicos; E. M. Lourie: A barreira hemato-encefálica e o líquido cérebro-raquidiano em relação com a eficácia dos medicamentos na doença do sono; J. H. Quastel: Ação dos narcóticos e da benzidrina sobre os processos metabólicos no sistema nervoso central; H. Mc Ilwan: Relações entre as ações *in vivo* e *in vitro* dos agentes quimioterápicos.

A segunda parte versa sobre os aspectos físico-químicos do modo de agir de diversas substâncias medicamentosas nos tecidos e organismos animais, sendo iniciada por um estudo geral da questão, feito por E. K. Rideal. Os temas estudados, nesta segunda parte, são os seguintes: H. R. Ing: Constituição química e ação farmacológica; H. King: Estrutura química dos arsenicais e resistência dos tripanosomas; H. Hurst: Princípios da ação inseticida como guia das relações entre a ação farmacológica e a fase de distribuição; J. H. Schulman: Algumas propriedades físico-químicas das moléculas biologicamente ativas; F. Weigert: Possível modo de ação do benzopireno como um cancerígeno químico típico; R. M. Lodge & C. N. Hinshelwood: Algumas variações morfo-

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

lógicas e de outras naturezas numa amostra de *Bact. lactis aerogenes*, acompanhando a sua adaptação à mudança de meio; G. H. Spray & R. M. Lodge: Ação do resorcinol e do m-cresol sobre o crescimento do *Bact. lactis aerogenes* e D. S. DAVIS & C. N. HINSHELWOOD: Adaptação do *Bact. lactis aerogenes* ao crescimento em presença de sulfonamidas.

Todas as contribuições apresentam bibliografia do assunto tratado, e são acompanhadas de discussões.

Pela lista dos temas estudados vê-se que houve tendência manifesta na escolha de assuntos correlacionados, principalmente com a quimioterapia nas infecções causadas por protozoários e organismos microbianos, questão, que desde longa data, vem despertando o interesse de numerosos pesquisadores. É interessante notar que as idéias e conceitos de Ehrlich, que foi um dos pioneiros do problema, ainda oferecem margem para o desenvolvimento das pesquisas.

A leitura dêste volume é valiosa para os farmacologistas, bioquímicos e fisiologistas, como, também, para qualquer outro interessado do assunto, e que deseja inteirar-se do estado atual do problema do modo de agir das várias substâncias no organismo.

M. Vianna Dias.

